

# Antikancerogena aktivnost nanočestica selena stabiliziranih pektinima rajčice i mandarine

---

Tesla, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:320161>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-21**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Lucija Tesla**

**Antikancerogena aktivnost nanočestica selena  
stabiliziranih pektinima rajčice i mandarine**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Fiziološki i biokemijski aspekti prehrane i izrađen na Zavodu za kemiju prehrane na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Dubravke Vitali Čepo.

Ovaj diplomski rad je nastao kao rezultat istraživanja u sklopu projekta „Primjena nanobiotehnologije u suplementaciji hrane sa selenom (HRZZ-IP-2018-01-8119)“ financiranom od strane Hrvatske zaklade za znanost.

This Master thesis was done as a result of investigations under the project entitled „Application of Nanobiotechnology for Nutritional Supplementation with Selenium – (HRZZ-IP-2018-01-8119)“ financed by Croatian Science Foundation.

*Hvala izv. prof. dr. sc. Dubravki Vitali Čepo na velikoj pomoći i strpljenju tijekom pisanja ovog diplomskog rada. Zahvaljujem i asistenticama Nikolini Golub i Kristini Radić na iznimnom trudu i pomoći tijekom izrade eksperimentalnog dijela diplomskog rada.*

*Posebno hvala mojoj obitelji i prijateljima na svim lijepim trenucima, riječima podrške i vjeri u mene.*

## SADRŽAJ

1 UVOD.....	1
1.1 Selen.....	1
1.1.1 Uvod.....	1
1.1.2 Oblici selena u prirodi .....	1
1.1.3 Izvori selena .....	2
1.1.4 Metabolizam selena .....	2
1.1.5 Uloge selena .....	3
1.2 Nanočestice .....	4
1.2.1 Nanotehnologija .....	4
1.2.2 Svojstva nanočestica.....	5
1.2.3 Vrste nanočestica.....	6
1.2.4 Toksičnost nanočestica .....	7
1.3 Nanočestice selena.....	7
1.3.1 Općenito o nanočesticama selena .....	7
1.3.2 Antitumorska svojstva nanočestica selena .....	8
1.3.3 Antimikrobna svojstva nanočestica selena .....	8
1.3.4 Antioksidativna svojstva nanočestica selena .....	9
1.3.5 Toksičnost nanočestica selena .....	9
1.3.6 Biosinteza nanočestica selena .....	10
1.4 Pektin kao sredstvo za oblaganje nanočestica .....	10
1.4.1 Prednosti polisaharidnih biopolimera kao sredstava za oblaganje nanočestica .....	10
1.4.2 Općenito o pektinu .....	11
1.4.3 Izvori pektina .....	11
1.4.4 Struktura pektina .....	12
1.4.5 Fizikalna svojstva pektina .....	13
1.4.6 Upotreba pektina .....	13
1.4.7 Sigurnost primjene pektina.....	14
1.5 Komina masline, mandarine i rajčice.....	14

1.5.1 Komina masline.....	14
1.5.2 Komina rajčice .....	15
1.5.3 Komina mandarine .....	15
1.6 Stanični modeli za istraživanje toksičnosti .....	16
1.6.1 HepG2 stanična linija .....	16
1.6.2 Caco-2 stanična linija .....	18
2 OBRAZLOŽENJE TEME.....	20
3 MATERIJALI I METODE.....	21
3.1 Instrumenti i oprema.....	21
3.2 Kemikalije .....	21
3.2.1 Reagensi i otopine .....	22
3.3 Metode .....	24
3.3.1 Sinteza nanoselena s pektinom kao sredstvom za oblaganje.....	24
3.3.2 Čišćenje uzoraka dijalizom.....	25
3.3.3 UV/VIS spektroskopija .....	25
3.3.4 Uparavanje nanoselena (izrada stock otopina za pokuse na stanicama).....	28
3.3.5 Određivanje raspodjele veličine nanočestica selena .....	28
3.3.6 Određivanje zeta potencijala nanočestica selena .....	29
3.3.7 Ispitivanje citotoksičnosti nanočestica selena na kulturi stanica Caco-2 .....	30
3.3.8 Ispitivanje citotoksičnosti nanočestica selena na kulturi stanica HepG2 .....	31
3.3.9 Kolorimetrijsko određivanje metaboličke aktivnosti stanica .....	31
3.3.9.1 Nasađivanje ploča s 96 jažica (2 dana prije tretmana) .....	32
3.3.9.2 Tretman stanica .....	32
3.3.9.3 MTT pokus (3 dana od nasađivanja ploča).....	33
3.3.10 Određivanje IC50 .....	33
3.3.11 Statistička analiza .....	34
4 REZULTATI I RASPRAVA .....	35
4.1 Relativna koncentracija nanočestica selena .....	35
4.2 Raspodjela veličine nanočestica selena.....	37

4.3 Zeta potencijal nanočestica selena .....	42
4.4 Antikancerogena aktivnost nanočestica selena .....	44
5 ZAKLJUČCI .....	48
6 LITERATURA .....	49
7 SAŽETAK .....	53
8 SUMMARY .....	54

# 1 UVOD

## 1.1 SELEN

### 1.1.1 Uvod

Selen je polumetal (metaloid) smješten u 16. skupini periodnog sustava elemenata između sumpora i telurija, atomske mase 78,96 i atomskog broja 34. Otkrio ga je 1817. godine švedski kemičar i liječnik Jöns Jakob Berzelius, a 1950-ih godina ustanovljeno je da je esencijalni element živih organizama važan u prehrani i medicini. Nužan je za poticanje imunološkog odgovora, reprodukcije kod životinja te normalnog rasta biljaka. Kao esencijalni element, on se ne može sintetizirati u organizmu, već ga je potrebno unositi hranom (Skalickova i sur., 2007). Riječ selen dolazi od grčke riječi za boginju Mjeseca što je povezano s time što ga se smatra „kemijskim elementom s dva lica“. Naime, selen je nužan za pravilno odvijanje brojnih bioloških procesa u organizmu te, ako ga se unosi u premalim količinama, dolazi do teških deficijencija. S druge strane, unesen u prevelikim dozama, djeluje toksično te ga se iz tog razloga u brojnim izvorima spominje pod nazivom „esencijalni otrov“ (El-Ramady i sur., 2014). Posebno je zanimljiv i zbog vrlo uskog raspona između preporučenog (55 µg/dan) i maksimalnog (400 µg/dan) dnevnog unosa što ukazuje na važnost njegove kontrolirane primjene (Skalickova i sur., 2007; Kapur i sur., 2017).

### 1.1.2 Oblici selena u prirodi

Jedan je od najrjeđih elemenata na svijetu (0,05 mg/kg) koji se u prirodi pojavljuje u različitim oblicima kao što su anorganski (selenidi, halidi, oksihalidi, soli, kiseline), organski (selenoaminokiseline, selenopeptidi, selenski derivati purina, pirimidina, kolina) te kompleksni biološki oblici (selenoenzimi, selenonukleinske kiseline). Oksidacijska stanja, u kojima se selen može nalaziti su 6 (VI), 4 (IV), 2 (II), 0 ( $\text{Se}^0$ ) te -2 (-II). Elementarni selen ( $\text{Se}^0$ ) postoji u različitim alotropskim modifikacijama kao što su romboedarski (sadrži  $\text{Se}_6$  molekule), 3 monoklinske crvene forme  $\alpha$ -,  $\beta$ - i  $\gamma$ -Se (sadrže  $\text{Se}_8$  molekule), heksagonalni sivi Se (sadrži helične polimerne lance te je termodinamički najstabilniji), amorfni crveni Se i crni staklasti Se. Elementarni selen u prirodi nastaje redukcijom selenata koju provode bakterije, a može podlijegati procesima oksidacije u  $\text{Se}^{4+}$  ili  $\text{Se}^{6+}$  ili se inkorporirati u željezne sulfide ( $\text{FeS}$ ) i

selenide. Sivi i crni elementarni selen su netopljivi zbog čega su posljedično i biološki inertni dok crveni elementarni selen proizvode bakterije iz selenita te je on ujedno i oblik selena koji ima najbolji učinak na hvatanje slobodnih radikala (Skalickova i sur., 2007; El-Ramady i sur., 2014).

### 1.1.3 Izvori selena

Primarni izvor selena je tlo u koje dopijeva trošenjem stijena, dok su sekundarni izvori vulkanske aktivnosti, prašina nastala izgaranjem ugljena, umjetna gnojiva te vode. Biljke i mikroorganizmi iz tla crpe selen, najčešće u obliku selenata ( $\text{SeO}_4^{2-}$ ) i selenita ( $\text{SeO}_3^{2-}$ ). Oba oblika mogu se reducirati u selenid ( $\text{Se}^{2-}$ ) i inkorporirati u aminokiseline kao što su selenocistein i selenometionin te kasnije činiti strukturne podjedinice biljnih proteina. Također, selen koji su biljke uzele iz tla, može se prevesti u hlapljive oblike (npr. dimetilselenid) koji odlaze u atmosferu te kasnije ponovno padaju na tlo. Količina selena u biljkama ovisi o geografskom položaju i vrsti tla na kojem rastu. Većina biljaka sadrži oko 25  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , a količina selena u biljkama rijetko može premašiti 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (El-Ramady i sur., 2014).

Glavni izvor selena kod ljudi je hrana u kojoj je selen inkorporiran u proteine animalnog ili biljnog tkiva. To su najvećim dijelom meso i žitarice, mliječni proizvodi, riba, a u manjoj mjeri voće i jaja. Posebno veliku količinu selena sadrže i brazilski oraščići (0,03-512 mg/kg). Iako prosječni dnevni unos selena varira od područja do područja te bi idealno bilo izračunati preporučene dnevne doze zasebno za svako geografsko područje ovisno o izvorima selena prisutnim u okolini, prihvaćene vrijednosti prosječnog dnevnog unosa iznose oko 60  $\mu\text{g}/\text{dan}$  za muškarce te 53  $\mu\text{g}/\text{dan}$  za žene (El-Ramady i sur., 2014).

### 1.1.4 Metabolizam selena

Selen se u suplementima pojavljuje u različitim anorganskim i organskim oblicima. Najjeftiniji oblici su anorganske soli selena poput selenita i selenata, međutim njihov nedostatak je vrlo varijabilna dostava u tkiva. Selenit ( $\text{SeO}_3^{2-}$ ) se apsorbira pasivnom difuzijom te neenzimski reagira s glutathionom pri čemu se formira selenodiglutation ( $\text{GS-Se-SG}$ ). Selenat ( $\text{SeO}_4^{2-}$ ) se apsorbira paracelularno pasivnom difuzijom te se u prisutnosti NADPH reducira u selenit koji onda ponovo u reakciji s glutathionom tvori selenodiglutation ( $\text{GS-Se-SG}$ ) koji se dalje enzimom GSH reduktazom metabolizira u glutatioselenol,  $\text{GSSeH}$ .  $\text{GSSeH}$  se dalje može razgraditi na



GSH i  $\text{Se}^0$  ili se enzimskim i neenzimskim putevima prevesti u selenid,  $\text{H}_2\text{Se}$ .  $\text{H}_2\text{Se}$  se zatim prevodi u selenofosfat ( $\text{HSePO}_3^{2-}$ ) koji se ili inkorporira u selenoproteine poput glutation peroksidaze ili izlučuje urinom. Organski oblici selena poput selenometionina pokazuju bolju bioraspoloživost u odnosu na anorganske oblike međutim njihova proizvodnja zahtjeva više vremena i novca te pri višim dozama pokazuju veću toksičnost. Selenometionin i selenocistein se apsorbiraju transcelularnim putevima uz pomoć različitih transportera primjerice za natrijeve ione. Selenometionin se može prevesti u selenocistein, SeCys koji se onda pomoću enzima selenocistein  $\beta$ -liaze prevodi, poput selenita, u selenid,  $\text{H}_2\text{Se}$  te nakon toga u selenofosfat koji se inkorporira u selenoproteine (Skalickova i sur., 2007).

### 1.1.5 Uloge selena

Već dugi niz godina, poznato je da je selen od velike važnosti za ljudski organizam zbog svoje antioksidativne aktivnosti. Za razliku od sumpora, s kojim se često uspoređuje zbog blizine položaja u periodnom sustavu elemenata, 4s orbitala selena snažno privlači jezgru koja je slabo zasjenjena potpuno popunjenim d orbitalama (efekt inertnog elektronskog para). Iz tog razloga, selen za razliku od sumpora ima maksimum oksidacijskog stanja +6. Selen je glavna komponenta enzima glutation peroksidaze (GPx), tioredoksin reduktaze (TRx) i dejodinaze koji sudjeluju u hvatanju slobodnih radikala štiteći stanice i tkiva od oksidacijskog stresa. Zahvaljujući svojoj antioksidativnoj aktivnosti, sudjeluje u prevenciji kardiovaskularnih bolesti, artritisa, mišićne distrofije i cistične fibroze (Skalickova i sur., 2007; Murugesan i sur., 2019). Kao što je spomenuto ranije, aktivnost selena ovisi o njegovoj količini u organizmu. Kada se unosi u rasponu od 55 - 400  $\mu\text{g}/\text{dan}$  aktivnost selenoenzima je povišena što omogućuje uspješno hvatanje slobodnih radikala i zaštitu organizma dok je kod unosa u previsokim količinama aktivnost tih enzima snižena i dolazi do pojave toksičnosti (Skalickova i sur., 2007; Kapur i sur., 2017).

Selen pokazuje protektivan učinak na imunološki sustav, antikancerogeno djelovanje te zaštitne učinke kod trovanja živom, metilživom, kadmijem i srebrom. Suplementacija selenom preporučuje se i kod brojnih stanja i bolesti kao što su HIV, Chronova bolest, kardiovaskularne bolesti, bolesti štitnjače te dijaliza kod bubrežne bolesti (Skalickova i sur., 2007). Kod nedostatka selena u organizmu primijećena je smanjena stanična imunost odnosno smanjen broj T-limfocita, smanjena obrana organizma protiv oksidacijskog stresa te brža progresija pojedinih bolesti (npr. HIV). Važnost adekvatnog unosa selena pokazuje i činjenica da je kod ljudi koji

su imali niži status selena zabilježena veća incidencija pojedinih bolesti kao što su rak prostate, cerviksa, pluća, kolona te rektuma (Kapur i sur., 2017). Iz svih navedenih razloga organski spojevi selena danas se koriste kao antioksidansi, inhibitori enzima, protutumorski lijekovi te lijekovi za poticanje pravilne reprodukcije i rada mišića. Osim u medicini, selen i njegovi spojevi svoju su ulogu pronašli i u elektronskoj industriji u proizvodnji fotoelektričnih ćelija te u industriji stakla i keramike. Također, sve više se koriste kao pigmenti u bojama, lubrikanti u metalurgiji te u niskim dozama i kao gnojivo za pospješivanje rasta biljaka (Murugesan i sur., 2019).

Iako se selen pokazao kao neizbježan element za normalno funkcioniranje ljudskog organizma, javlja se problem njegove primjene u prevelikim količinama. Do potencijalne opasnosti kod suplementacije selenom dolazi zbog čestog zaboravljanja na rizike do kojih dovodi njegov unos u previsokim koncentracijama. Ako se dulje vrijeme uzima u dozama višim od 350-400 µg/dan dolazi do pojave simptoma toksičnosti. Stanje uzrokovano prevelikom količinom selena naziva se selenoza te ona može biti akutna i kronična. Simptomi akutne selenoze su anoreksija, alopecija, konvulzije, pothlađenost, dok su simptomi kronične selenoze zadah po češnjaku, gubitak kose i noktiju, krhkost noktiju, lezije na koži te snižena razina hemoglobina (Kapur i sur., 2017). Zbog navedenih nuspojava, danas se sve više radi na istraživanju novih, manje toksičnih oblika primjene selena.

## **1.2 NANOČESTICE**

### **1.2.1 Nanotehnologija**

Pojam nanočestice označava čestice veličine između 1 i 100 nm, a tehnologija kojom se proizvode naziva se nanotehnologija. U današnje vrijeme nanotehnologija poprima sve veći značaj te bilježi brz razvoj u brojnim područjima kao što su automobilska industrija, transport, proizvodnja biosenzora, prehrambena i kozmetička industrija, biomedicina, optika, energetika te elektrokemija (Murugesan i sur., 2019).

Nanočestice, zbog svojih specifičnih svojstava, posljednjih godina postaju glavni predmet interesa znanstvenika u biomedicinskim područjima. Naime, tradicionalni sustavi dostave lijekova često imaju slabu apsorpciju i povećanu toksičnost, slabo vrijeme zadržavanja, slabu permeabilnost i topljivost. Također, čest je problem nestabilnosti tijekom procesa proizvodnje

zbog izloženosti povišenoj temperaturi, kisiku, svjetlosti te problem nestabilnosti u gastrointestinalnom traktu zbog promjene pH, enzima i prisutnosti ostalih nutrijenata. Primjerice, bioaktivne supstance poput derivata lipida, peptida, minerala, vitamina često podliježu procesu razgradnje u gastrointestinalnom traktu ili pak teško prolaze biološke barijere što za posljedicu ima lošu distribuciju u tkiva. Cilj novijih sustava dostave aktivnih tvari, pa tako i nanotehnologije, je pronalaženje boljeg načina za postizanje djelotvorne koncentracije aktivne tvari na željenom mjestu u organizmu (Martínez-Ballesta i sur., 2018).

### **1.2.2 Svojstva nanočestica**

Svojstva nanočestica ovise o različitim parametrima. Apsorpcija i transport nanočestica ovise o obliku, veličini, volumenu i površini čestica, interakciji s proteinima te aglomeraciji (aglomeracija primjerice može biti uzrokovana promjenama pH duž gastrointestinalnog trakta). Tako je kod inkubacije nanočestica selena u uvjetima gastrointestinalnog trakta (pH 2-7) pokazano da su pri pH=2 nanočestice bile manje (veličine 2-11 nm), a pri pH=7 veće (veličine 50 nm) (Skalickova i sur., 2007). Djelotvornost nanočestica također ovisi i o svojstvima površine matriksnog materijala, strukturi odjeljka čestice, disperziji i stabilnost u gastrointestinalnom traktu, profilu oslobađanja, efikasnosti transporta kroz endotel, sistemske distribuciji te o mogućnosti kontrole utjecaja metabolizma mikrobiotom u crijevu (Martínez-Ballesta i sur., 2018).

Nanočestice su, u odnosu na klasične sustave dostave lijekova, tijekom oralne primjene pokazale brojne prednosti. Pokazano je da poboljšavaju disperziju inicijalno u vodi netopljivih spojeva te da matriks nanočestice štiti bioaktivni spoj od oksidacije, kiselih i alkalnih uvjeta u želucu i tankom crijevu. Uz to pružaju i mogućnost ciljanja specifičnih mjesta dostave u organizmu, zahvaljujući upotrebi mukoadhezivnih polimera koji omogućavaju dulje zadržavanje nanočestica na površinama mukoze. Sve naprednije tehnologije proizvodnje nanočestica omogućuju prilagodbu veličine i morfologije čestica željenim svojstvima i profilu oslobađanja nanočestica ovisno o primjeni za koju su namijenjene (Hosnedlova i sur., 2018; Martínez-Ballesta i sur., 2018).

Nanočestice pokazuju specifično ponašanje u uvjetima koji vladaju u gastrointestinalnom traktu. Debljina mukoze u crijevima varira od 200  $\mu\text{m}$  u tankom crijevu do između 480 i 800  $\mu\text{m}$  u debelom crijevu. Veličina pora u mukozi je 100  $\mu\text{m}$  što omogućava transport nanočestica

kroz taj sloj. Najveću važnost tijekom prolaska kroz pore mukoze imaju veličina i naboj nanočestice. Nakon penetracije kroz mukozu nanočestice moraju prijeći epitelne stanice koje su polarizirane i često organizirane u različite slojeve. Debljina epitela gastrointestinalnog trakta je od 20 do 800  $\mu\text{m}$ . Nanočestice zbog svoje veličine nemaju mogućnost transporta paracelularnim putem. Uz aktivni i pasivni transport, nanočestice kroz epitel prolaze makropinocitozom te endocitozom (Skalickova i sur., 2007).

### 1.2.3 Vrste nanočestica

Najčešće korištena vrsta nanočestica u biomedicini i prehrambenoj tehnologiji su čvrste lipidne nanočestice koje mogu biti građene od različitih vrsta lipida (masnih kiselina, steroida, voskova, monoglicerida, diglicerida, triglicerida). Neke od čestih vrsta lipidnih nanočestica su liposomi, micelle te niosomi. Kao dobra zamjena za lipidne nanočestice, danas se sve više nameću polisaharidne nanočestice iz razloga što je pokazano da polisaharidi kao sredstva za oblaganje mogu reagirati sa specifičnim receptorima u stanicama i tkivima što omogućava ciljanu dostavu lijekova na željeno mjesto u organizmu (Martínez-Ballesta i sur., 2018).

Posebnu vrstu nanočestica predstavljaju metalne nanočestice koje posjeduju specifična fizikalno-kemijska, biološka, mehanička, magnetska i optička svojstva. Najčešće korištene metalne nanočestice su nanočestice srebra, zlata, platine, selen, željeza, kobalta i mangana (Nair i sur., 2021). One su građene od metalnih iona konjugiranih s različitim organskim i anorganskim molekulama koje omogućuju njihovu dostavu na ciljano mjesto te smanjenje njihove toksičnosti. Naime, metalne nanočestice imaju sposobnost stvaranja reaktivnih kisikovih i dušikovih spojeva koji mogu dovesti do oštećenja proteina i DNA molekula te uzrokovati smrt stanice. Kako bi se spriječili navedeni učinci i oštećenje zdravih stanica, posebno je važno koristiti ih u obliku konjugata s prikladnim molekulama koje povećavaju njihovu učinkovitost i specifičnost te smanjuju njihovu toksičnost (Kuchur i sur., 2020). Metalne nanočestice pokazuju sposobnost disrupcije membrana mikroorganizama i smanjenja aktivnosti mikrobnih enzima te se sve više radi na njihovom razvoju u kontekstu antimikrobne terapije. Također, zbog svoje sposobnosti da stvaraju slobodne radikale pokazuju i dobra antitumorska svojstva. Zaključno, dosadašnja saznanja upućuju na to da metalne nanočestice, konjugirane s prikladnim molekulama i proizvedene na prikladan način predstavljaju dobru alternativu za ciljanu antimikrobnu i antitumorsku terapiju (Nair i sur., 2021).

#### **1.2.4 Toksičnost nanočestica**

Iako pokazuju velik potencijal primjene u biomedicini i prehrambenoj tehnologiji, još uvijek se ne zna dovoljno o neželjenim učincima nanočestica nakon dugotrajne primjene. Pretpostavljeni mehanizam toksičnosti nanočestica je povećanje koncentracije reaktivnih kisikovih vrsta i slobodnih radikala što dovodi do oksidacijskog stresa i stanja upale. Moguć uzrok tome su ostaci otapala tijekom procesa proizvodnje te toksičnost korištenih polimera. Količina toksičnosti uvelike ovisi o vrsti primijenjenih nanočestica, njihovoj veličini i obliku te kapacitetu prolaska kroz biološke barijere. Do sada su zabilježeni toksični učinci na jetru, bubrege i slezenu. Također, neke studije pokazale su da nanočestice mogu pretjerano potaknuti imunološki sustav što za posljedicu može imati razvoj reakcija preosjetljivosti (a s druge strane otvara mogućnost uporabe nanočestica u izradi cjepiva). Iz svega navedenog, može se zaključiti da je još uvijek potrebno pojačano praćenje i dodatno istraživanje djelovanja nanočestica na biološke sustave te da njihov konačni učinak uvelike ovisi o vrsti, veličini nanočestica i primijenjenoj dozi (Martínez-Ballesta i sur., 2018).

### **1.3 NANOČESTICE SELENA**

#### **1.3.1 Općenito o nanočesticama selena**

Govoreći o nanočesticama selena, dosada je pokazano da one imaju veću bioraspoloživost te manju toksičnost od anorganskih i organskih oblika selena (Skalickova i sur., 2007). U obliku nanočestica, selen može dolaziti u oksidacijskom stanju 0 te kao takav pokazuje manju toksičnost i puno bolju bioraspoloživost od klasičnih oblika. Problem elementarnog oblika selena je što je nestabilniji te se vrlo lako transformira u inaktivnu formu. Suvremena tehnologija omogućila je rješavanje tog problema stabilizacijom nanočestica selena polimerima poput kitozana (Hosnedlova i sur., 2018). Kao i kod ostalih nanosustava, pokazano je da svojstva nanočestica selena uvelike ovise o njihovoj veličini (manje čestice pokazuju veću aktivnost i bolju apsorpciju, ali i veću toksičnost). Osim što je pokazano da u većoj mjeri imaju sposobnost povećanja aktivnosti selenoenzima, nanočestice selena veličine 36 nm pokazale su manju toksičnost usporedno sa selenometioninom ili selenitom (Skalickova i sur., 2007).

### 1.3.2 Antitumorska svojstva nanočestica selen

Nanočestice selen pokazale su širok spektar primjene. Velik potencijal pokazuju u razvoju antitumorskih lijekova zbog mogućnosti ciljane dostave lijeka u tumorske stanice u visokim dozama. Pokazano je da smanjuju proliferaciju tumorskih stanica te imaju inhibitorni učinak na enzim MMP (metaloproteinazu matriksa) koji razgrađuje izvanstanični matriks te tako omogućava stanicama raka da migriraju odnosno metastaziraju. Nekim istraživanjima na stanicama tumora dojke pokazalo se da nanočestice selen mogu inducirati selektivnu smrt stanica i ekspresiju proteina koji reguliraju apoptozu (pp38, Bax, citokrom C) (Skalickova i sur., 2007).

### 1.3.3 Antimikrobna svojstva nanočestica selen

Čestice nanoselen pokazale su se kao vrlo dobro potencijalno rješenje rastućeg svjetskog zdravstvenog problema rezistencije na antibiotike. Najprihvaćeniji mehanizam antibakterijske aktivnosti nanočestica selen je vezanje nanočestica za površinske dijelove bakterija te ulazak iona selen u bakterijski zid što uzrokuje oksidacijski stres, inhibiciju sinteze proteina i mutacije DNA bakterija. Naspram mnogih bakterija kao što su *Ralstonia eutropha*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis* nanočestice selen pokazale su antibakterijsku aktivnost usporedivu s ampicilinom. Vrlo važna je i njihova antibakterijska aktivnost naspram bakterije *Staphylococcus aureus*, koja zbog mogućnosti stvaranja biofilma, pokazuje rezistenciju na sve veći broj antibiotika. Također, kod suplementacije nanočesticama selen pokazana je učinkovitija reakcija imunskog sustava na infekcije virusima gripe H1N1 i HIV-a. Osim učinka na bakterije i viruse, nanočestice selen pokazale su i sposobnost inhibicije rasta micelija gljivica poput *Colletotrichum coccode* i *Penicillium digitatum* te zaustavljanja rasta gljivice *Aspergillus clavatus*. Kada su se dendritičke stanice i fibroblasti izložili nanočesticama selen, nije uočen gubitak viabilnosti stanica, povećanje količine reaktivnih kisikovih vrsta te povećanje proupalnih i imunostimulatornih citokina. To upućuje da bi nanočestice selen mogle biti dobri kandidati za sigurnu primjenu kod obrane organizma od infekcija, kako same tako i u kombinaciji s antibioticima (Skalickova i sur., 2007, Hosnedlova i sur., 2018, Fardsadegh i Jafarizadeh, 2019).

### **1.3.4 Antioksidativna aktivnost nanočestica selena**

Uspoređujući antioksidativnu aktivnost nanoselena s aktivnošću organskog oblika selena, selenometioninom ustanovljeno je da nanoselen pokazuje jednak učinak na poticanje aktivnosti enzima glutathion peroksidaze, ali s puno manjim mehanizmom toksičnosti. Povećanje aktivnosti glutathion peroksidaze, suplementacijom nanoselenom od velike je važnosti u testisima, gdje oksidativni stres može uzrokovati gubitak plodnosti zbog lipidne peroksidacije koja uzrokuje gubitak integriteta membrane mitohondrija u spermiju te na taj način i disfunkciju spermija. Također, pokazalo se da nanoselen potiče antioksidativnu aktivnost u koži fetusa što pozitivno utječe na regulaciju IGFa (inzulinu sličnog faktora rasta) i njegovog receptora IGF-IR (Hosnedlova i sur., 2018).

### **1.3.5 Toksičnost nanočestica selena**

U kontekstu toksičnosti nanoselena studije su pokazale da elementarni selen u nanočesticama pokazuje puno manju toksičnost u usporedbi sa SeMet i SeCys uz jednaku djelotvornost. Veća toksičnost selenita, selenocisteina i selenovog oksida povezana je sa sposobnošću da iniciraju oksidaciju tiolnih skupina proteina što dovodi do promjene aktivnosti esencijalnih enzima koji sadrže sulfhidridnu skupinu. Selenit u većoj mjeri reducira jetrenu glutathion peroksidazu i povećava produkciju MDA (malondialdehida, produkta lipidne peroksidacije). Također, selenit reducira aktivnost antioksidativnih enzima superoksid dismutaze i katalaze u jetri u puno većoj mjeri nego nanoselen (Hosnedlova i sur., 2018). Toksičnost nanoselena uvelike ovisi o veličini čestica. Manje čestice zbog veće površine te većeg broja po jedinici mase mogu izazvati neželjene učinke u respiratornom traktu i uzrokovati jaču upalu. Činjenica da su makrofazi učinkovitiji kod uklanjanja većih čestica upućuje na to da bi se toksičnost nanočestica mogla reducirati stvaranjem agregata nanočestica čija je veličina veća od 100 nm (100 nm se često uzima kao prag toksičnosti nanočestica) (Kapur i sur., 2017).

### **1.3.6 Biosinteza nanočestica selena**

Tradicionalne kemijske i fizikalne metode sinteze nanočestica selena uključuju skupe, neodržive i dugotrajne postupke. Kako bi se nadvladali nedostaci tradicionalnih metoda, sve više do izražaja dolazi takozvana „zelena nanotehnologija“. Zelena sinteza nanočestica selena je sigurna, netoksična te ima mogućnost korištenja aktivnosti enzima iz bakterija, gljiva i biljaka. Sinteza nanočestica selena iz biljaka, posebno je zahvalna jer isključuje skupu izolaciju i uzgoj mikroorganizama te je kao takva vrlo jeftina, jednostavna i brza. Također, biosintezom iz biljaka izbjegava se upotreba toksičnih kemikalija. Bioaktivne sastavnice u biljkama kao što su flavonoidi, alkaloidi, fenoli, saponini, ugljikohidrati, kinini, glikozidi, tanini i steroidi prirodni su reducenski i stabilizatori koji olakšavaju biosintezu i omogućavaju da se ona odvija u jednom koraku. Navedeni spojevi omogućuju brzu i jednostavnu redukciju natrijevog selenita u elementarni selen (Korde i sur., 2020). Glavni problem klasične biosinteze u kojoj se kao reducirajući agensi koriste askorbinska kiselina i fenoli iz biljaka je nestabilnost nastalih nanočestica. Kako bi se čestice stabilizirale, danas se tijekom procesa biosinteze dodaju stabilizirajući agensi poput polisaharidnih biopolimera iz različitih biljnih ekstrakata (npr. pektin) (Mellinas i sur., 2019).

## **1.4 PEKTIN KAO SREDSTVO ZA OBLAGANJE NANOČESTICA**

### **1.4.1 Prednosti polisaharidnih biopolimera kao sredstava za oblaganje nanočestica**

Posljednjih godina polisaharidni biopolimeri, zahvaljujući svojoj strukturi te posebnim fizikalnim i kemijskim svojstvima, zauzeli su vrlo važno mjesto kao strukturne komponente sustava za dostavu lijekova. Zbog svojih amfifilnih svojstava koja omogućuju samouklapanje u vodenom okolišu te formiranje specifičnih struktura i šupljina sve se više upotrebljavaju kao stabilizirajući agensi u sintezi nanočestica kao što su nanočestice srebra, zlata, selena te cinkovog oksida. Tako proizvedene nanočestice dobra su alternativa za izradu sustava kontroliranog i produljenog oslobađanja lijekova. Također, njihova velika prednost je posjedovanje specifičnih funkcionalnih skupina na površini koje pokazuju visoki afinitet prema mukozama gastrointestinalnog i respiratornog trakta. Uz sve navedeno, razlog zašto se biopolimerima pridaje sve veća važnost je njihova veća ekološka prihvatljivost u odnosu na sintetske polimere (Martínez-Ballesta i sur., 2018).



## 1.4.2 Općenito o pektinu

Sve popularniji polisaharidni biopolimer je pektin. Riječ pektin dolazi od grčke riječi *pēktós* što znači čvrst, otvrdnut ([www.jezikoslovac.com](http://www.jezikoslovac.com)). Otkriven je 1790. godine u jabučnom soku. Danas se zna da je pektin zajedno s celulozom, hemicelulozom, glikoproteinima i ligninom glavna strukturna komponenta staničnog zida viših biljaka te su stoga biljke i njegov glavni izvor. Najviše pektina nalazi se u središnjoj lameli primarnog staničnog zida, dok ga u sekundarnom staničnom zidu ispred stanične membrane ima vrlo malo. Osim toga važan je i u metabolizmu biljaka kao tvar koja zadržava vodu, sudjeluju u transportu iona te utječe na rast, veličinu i oblik biljnih stanica (Cho i sur., ured., 2009, Chan i sur., 2017).

## 1.4.3 Izvori pektina

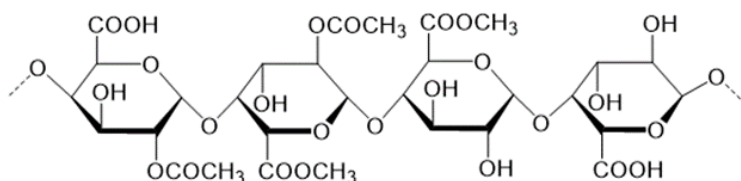
Iako se nalazi u velikom broju biljnih vrsta, izvori pektina za komercijalnu upotrebu vrlo su limitirani (Tablica 1). U komercijalne svrhe pektin se najčešće ekstrahira iz kore limuna, komine jabuke te u manjoj mjeri iz pulpe slatke repice. Kora limuna i komina jabuke u velikoj se količini dobivaju kao nusprodukti u proizvodnji sokova i esencijalnih ulja dok pulpa slatke repice ostaje kao nusprodukt u šećernoj industriji. Važno je naglasiti da različite vrste biljaka u svojoj strukturi sadrže različite udjele pektina te se pektini iz različitih biljaka razlikuju svojim fizikalno-kemijskim svojstvima (Chan i sur., 2017).

**Tablica 1:** Glavni izvori pektina (Chan i sur., 2017)

<b>IZVOR</b>	<b>POSTOTAK PEKTINA (%)</b>
<b>komina jabuke</b>	4,60-20,92
<b>kora naranče</b>	10,90-24,80
<b>kora grejpa</b>	21,60-28,00
<b>kora limuna</b>	20,90-30,60
<b>kora limete</b>	9,00-33,60
<b>pulpa šećerne repice</b>	4,10-24,96

#### 1.4.4 Struktura pektina

Iako je prošlo više od dva stoljeća od otkrića pektina, njegova potpuna struktura je zbog svoje nehomogenosti i dalje predmet istraživanja brojnih studija. Poznato je da je on sastavljen od barem 17 različitih monosaharida uključujući  $\alpha$ -D-galakturonsku kiselinu (u najvećoj mjeri), L-arabinozu, D-galaktozu, L-ramnozu i druge. Ti monosaharidi međusobno su povezani s 20 različitih vrsta veza (Chan i sur., 2017). Osnovu strukture pektina čine molekule  $\alpha$ -D-galakturonske kiseline povezane linearno 1,4 glikozidnom vezom (Slika 1). Svojstva pektina određena su stupnjem esterifikacije (DE=degree of esterification) te stupnjem amidacije (DA=degree of amidation). Najčešći oblici estera koji se formiraju na karboksilnim i hidroksilnim skupinama pektina su metil i O-acetil esteri. O-acetil esteri nastaju primarno na O-3 poziciji, a rjeđe na O-2 poziciji. U lanac formiran linearno povezanim molekulama  $\alpha$ -D-galakturonske kiseline mogu biti inkorporirane molekule (1,2)-L-ramnopiranoze koje uzrokuju pregibe u linearnom lancu te formiraju „zig-zag“ oblik molekule. Stupanj esterifikacije pektina također ovisi i o porijeklu te je uvjetovan aktivnošću enzima pektinesteraza tijekom procesa sazrijevanja biljke. Pektini koji imaju stupanj esterifikacije veći od 50% nazivaju se visoko metilesterificirani pektini, a pektini sa stupnjem esterifikacije manjim od 50% nisko metilesterificirani pektini. Neesterificirani pektin još se naziva i pektinska kiselina, a njezine soli pektati. Iz brojnih vrsta voća izolirani su pektini koji sadrže arabinanske bočne lance. Arabinani su polisaharidi sastavljeni od arabinofuranozilnih jedinica povezanih  $\alpha$ -(1,5) glikozidnom vezom koje na sebe, kao postranične lance, imaju vezane arabinozilne jedinice  $\alpha$ -(1,2)- i  $\alpha$ -(1,3) glikozidnom vezom. U nekim biljkama, u strukturi pektina kao postranični lanci mogu se naći i L-arabinoze i L-galaktoze te se takve strukture nazivaju arabinogalaktani. Kratke unimolekularne postranične lance mogu formirati i neutralni šećeri poput D-ksiloze, D-glukoze i D-manoze. Kao terminalna molekula postraničnih lanaca često se može naći i D-fukoza. Distribucija ramnoze, kao i postraničnih šećernih lanaca je neravnomjerna. Regije s malo ramnoze nazivaju se homogalakturonanske ili glatke regije (Cho i sur., ured., 2009).



**Slika 1:** Osnovna struktura molekule pektina.

#### 1.4.5 Fizikalna svojstva pektina

Što se tiče fizikalnih svojstava pektina, on je dobro topljiv u vodi, a slabo topljiv u organskim otapalima. Zbog svojih karboksilnih skupina on je slaba organska kiselina te u vodenoj otopini dolazi do disocijacije vodikovog iona pri čemu molekula pektina postaje negativno nabijena. Stabilan je u kiselim uvjetima od pH=2 do pH=4,5. Stabilnost pektina i njegova svojstva, kao što je ranije spomenuto, uvelike ovise i o stupnju njegove disocijacije. Pri pH vrijednostima manjima od 2 dolazi do deesterifikacije pektina te visoko metilesterificirani pektin prelazi u nisko metilesterificirani pektin. Pri pH vrijednostima iznad 4,5 dolazi do degradacije pektina u procesu koji se naziva  $\beta$ -eliminacija. U tom procesu dolazi do cijepanja pektina pokraj metilesterificirane molekule galakturonske kiseline. Pektinska kiselina i njezine soli, iz razloga što ne sadrže esterificirane skupine, najstabilniji su oblici pektina. Zahvaljujući svojoj molekulskoj masi i strukturi, pektin u velikoj mjeri navlači molekule vode. U reakciji s karboksilnim skupinama, dvovalentni ioni metala potiču unakrsno vezanje molekula pektina što povećava njegovu viskoznost. (Cho i sur., ured., 2009).

#### 1.4.6 Upotreba pektina

Kao što je već navedeno, u komercijalne svrhe pektin se najviše upotrebljava zbog svojih gelirajućih svojstava. Pod specifičnim uvjetima, pektin formira trodimenzionalnu mrežu koja je stabilizirana interakcijama između molekula pektina. Kako bi došlo do formiranja gela, potrebna je određena koncentracija i masa pektina, odgovarajuća pH vrijednost, ionska jakost kao i valencija i vrsta iona te temperatura proizvodnog procesa (Cho i sur., ured., 2009). Također, pektin, zajedno s drugim biopolimerima pokazuje vrlo dobre učinke u proizvodnji i stabilizaciji metalnih nanočestica te je zbog svog prirodnog porijekla i povoljnog sigurnosnog profila sve češći izbor kao sredstvo za oblaganje u nanotehnologiji (J.Ngenefeme i sur., 2013). Iako se najčešće koristi kao gelirajući agens, stabilizator ili sredstvo za povećanje viskoznosti u prehrambenoj industriji, pektin je također i prehrambeno vlakno koje se nalazi u voću i povrću te pokazuje pozitivne učinke na ljudsko zdravlje (Cho i Samuel, 2009).

### **1.4.7 Sigurnost primjene pektina**

Gledano sa strane sigurnosti za ljudski organizam, The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) proglasila je pektin sigurnim za upotrebu te ne postoji gornja preporučena granica njegova unosa. Iako ljudi nemaju enzime za razgradnju pektina, bakterije gastrointestinalnog trakta poput bakterija iz rodova *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Erwinia*, *Escherichia* i *Eubacterium* mogu koristiti pektin kao supstrat u procesu fermentacije. Pektin je dovoljno stabilan u kiselim uvjetima želuca te bi bez prisutnosti bakterija kroz gastrointestinalni trakt mogao proći gotovo netaknut. Velikim brojem studija, pokazano je da pektin ima brojne pozitivne utjecaje na ljudsko zdravlje koji uključuju unaprjeđenje zdravlja debelog crijeva, sniženje serumskih razina kolesterola, održavanje normoglikemije te poticanje odgovora imunskog sustava (Chan i sur., 2017).

## **1.5 KOMINA MASLINE, MANDARINE I RAJČICE**

Prehrambena industrija svakodnevno se suočava s ekološkim i ekonomskim aspektima problema nastajanja velikih količina prehrambenog otpada tijekom procesa proizvodnje. Iz tog razloga nastali se otpad sve više nastoji iskoristiti u daljnje svrhe kao potencijalni izvor energije ili bioaktivnih sastavnica (Ribeiro et al., 2020). Komina je naziv za vrstu prehrambenog otpada u čvrstom stanju odnosno ostatak voća u proizvodnji soka, vina ili drugih proizvoda. Studije su pokazale kako je komina različitih vrsta uglavnom vrlo bogat izvor biološki aktivnih spojeva te da kao takva posjeduje značajan potencijal za daljnje iskorištavanje u različite svrhe (Hayat i sur., 2010).

### **1.5.1 Komina masline**

Komina masline u velikim količinama nastaje tijekom procesa proizvodnje djevičanskog maslinovog ulja. Uočeno je da se iz nje mogu ekstrahirati brojni biološki aktivni spojevi. Među njima se mogu naći polifenoli, hidroksitirozol i njegovi derivati, iridoidi, sekoiridoidi (oleuropein), bioflavonoidi (rutin, apigenin, luteolin, kvercetin), lignani (pinorezinol), fenolne kiseline (cimetna, kavena), tokoferoli, tokotrienoli, steroli, skvaleni i karotenoidi. Uz sve to komina masline sadrži i mnogo prehrambenih vlakana (npr. pektin), minerala, oligosaharida kao i monozasićene i polizasićene masne kiseline. Fenolni spojevi iz komine masline djeluju

kao antioksidansi te u koži inhibiraju aktivnost enzima kolagenaze i elastaze zbog čega se zajedno sa skvalenom koji djeluje kao antioksidans, emolijens i ovlaživač koriste u kozmetičkoj industriji. Također, osim u kozmetičke svrhe spojevi iz komine masline, zbog svojih antioksidativnih, protuupalnih, antikancerogenih i antihipertenzivnih učinaka imaju čestu primjenu u biomedicinskom području (Difonzo i sur., 2020).

### **1.5.2 Komina rajčice**

Rajčica (*Lycopersicon esculentum* Mill.), biljka je koja se u velikoj mjeri upotrebljava u prehrambene svrhe u mediteranskim zemljama. Osim u svježem obliku, konzumira se u obliku soka, pirea, tijesta te različitih umaka. U proizvodnji navedenih proizvoda, kao nusprodukt zaostaje komina rajčice koja ima velik potencijal za daljnju upotrebu. Komina rajčice sastoji se primarno od kore i sjemenki rajčice. Ovisno o izvoru, ustanovljeno je da ona sadrži između 25.4% i 50.0% vlakana (među ostalim i pektin), između 15.4% i 23.7% proteina, između 5.4% i 20.5% masti te između 4.4% i 6.8% minerala (Del Valle i sur., 2006). Osim navedenog, ona sadrži i velik broj različitih fenolnih spojeva poput bioflavonoida (rutin, kvercetin, naringenin) i fenolnih kiselina (kavena, cimetna, ferulinska, klorogenska, ružmarinska). Ti spojevi pokazuju snažnu antioksidativnu aktivnost odnosno smanjuju oksidacijski stres uzrokovan slobodnim radikalima te doprinose zaštiti staničnih proteina, lipida i nukleinskih kiselina. Osim antioksidativne aktivnosti, pri višim koncentracijama zabilježen je i antiproliferativni učinak na stanične linije HeLa, MCF7 and MRC-5. Sve navedeno upućuje da komina rajčice, iako proizvedena kao nusprodukt u proizvodnji, posjeduje brojne pozitivne učinke te zahtjeva daljnja istraživanja u svrhu upotrebe u biomedicini (Ćetković i sur., 2012).

### **1.5.3 Komina mandarine**

Uzgoj mandarina i njihova konzumacija raste iz godine u godinu te je prema posljednjim izvorima 2021. godine proizvedeno oko 33,1 milijuna tona mandarina (<https://agnetmedia.com/>). Rastući trend djelomično je povezan i s time što se nusprodukti nastali u procesima prerade mandarina sve više upotrebljavaju kao izvor prehrambenih vlakana (kao što je pektin). Osim što su bogati prehrambenim vlaknima, nusprodukti nastali preradbom mandarina (poput komine) bogati su različitim biološki aktivnim sastavnicama. Najveći interes za daljnje iskorištavanje u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji izazivaju spojevi koji posjeduju antioksidativnu aktivnost poput fenolnih kiselina (galna,  $\rho$ -hidroksibenzojeva,

vanilična,  $\rho$ -kumarinska, ferulična) i bioflavonoida (katehin, naringin, naringenin, hesperidin, kempferol, izorhamnetin) (Hayat i sur., 2010).

## 1.6 STANIČNI MODELI ZA ISTRAŽIVANJE TOKSIČNOSTI

Stanične kulture, zbog svoje sličnosti s primarnim tkivima, prihvatljive cijene te jednostavnosti uvelike se koriste u znanstvenim istraživanjima. One predstavljaju neiscrpan izvor biološkog materijala te smanjuju potrebu za etički problematičnim istraživanjima na ljudima i životinjama. Neke od njihovih najčešćih primjena su proizvodnja cjepiva, ispitivanja citotoksičnosti, identifikacija metaboličkih puteva lijekova, istraživanje funkcija gena, sinteza terapijskih proteina i mnoge druge (Arzumanian i sur., 2021).

### 1.6.1 HepG2 stanična linija

Zahvaljujući svom širokom spektru primjena te posjedovanju glavnih karakteristika hepatocita, iznimno veliku popularnost stekla je stanična linija HepG2 stanica. HepG2 stanice izolirane su 1975. godine biopsijom jetre petnaestogodišnjaka bijele rase te su primarno opisane kao hepatocelularni karcinom (HCC). Kasnije je uočeno da posjeduju karakteristike najbližnje tumorskim stanicama hepatoblastoma. Iako su njihove funkcije limitirane u odnosu na zdrave hepatocite, pokazuju brojne prednosti kod in vitro ispitivanja kao što su laka dostupnost, jednostavno rukovanje, dug životni vijek, stabilan fenotip koji ne ovisi o karakteristikama donora te velika sposobnost proliferacije. HepG2 stanice također posjeduju brojne funkcije hepatocita kao što su sinteza i sekrecija proteina plazme i kolesterola, metabolizam i transport triglicerida te sinteza žučnih kiselina i glikogena. Njihov najveći nedostatak je smanjena ekspresija transportera i metaboličkih enzima, posebice onih iz porodice citokroma P450 koji su ključni za prvu fazu metabolizma lijekova u jetri (CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19, CYP2A6, CYP2D6). Ekspresija enzima druge faze metabolizma lijekova poput uridin difosfat glukuronoziltransferaze, glutation-S-transferaze, sulfotransferaze te N-acetiltransferaze također je smanjena, ali je aktivnost mRNA usporediva onoj kod primarnih hepatocita. Zahvaljujući današnjim tehnologijama, razvijene su brojne strategije za unaprjeđenje svojstava HepG2 stanične linije. Jedna od njih je transfekcija stanica vektorima koji nose gene za specifične proteine ili transkripcijske faktore pri čemu kao rezultat nastaju stanice koje mogu eksprimirati CYP i druge metaboličke enzime. Što se tiče citoloških karakteristika, HepG2 imaju promjer između 10 i 20  $\mu\text{m}$  te sadrže od 3 do 7 jezgara. Za razliku od zdravih hepatocita

koji, zbog potrebe za intenzivnom sintezom proteina i stanične energije imaju veliku aktivnost glatkog endoplazmatskog retikuluma i mitohondrija, HepG2 stanice imaju slabo razvijen glatki endoplazmatski retikulum te 50% manje mitohondrija nego zdravi hepatociti. Iako imaju manji broj citoplazmatski organela kao što mitohondriji i hrapavi endoplazmatski retikulum, strukturnom analizom utvrđeno je da posjeduju brojne međustanične veze te velik broj intermedijarnih filamenata (Vinken i sur.; 2016; Arzumanić i sur., 2021).

Najčešći medij za uzgoj HepG2 stanica je DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) obogaćen s 10% fetalnog goveđeg seruma. Osim u DMEMu, HepG2 stanice također se mogu uzgajati i u medijima pod nazivom EMEM (Eagle's Minimum Essential medium) i RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640). Stanice se kultiviraju u bocama za kultivaciju pri temperaturi od 37°C u vlažnoj atmosferi koja sadrži 5% ugljikova dioksida. One su nalik epitelnim stanicama te formiraju monosloj na površini. Medij je potrebno mijenjati svaka 2 dana aspirirajući supernatant i dodavanjem novog medija zagrijanog na temperaturu od 37 °C. Kada stanice prekriju 80% površine boce za kultivaciju moraju se presaditi tripsinizacijom. Medij, otopina tripsina u etilendiamintetraoctenoj kiselini (EDTA) i otopina fosfatnog pufera zagriju se na temperaturu od 37 °C. Medij iz kulture se aspirira te se monosloj stanica ispere s otopinom fosfatnog pufera. Lagano se promućka kako bi se uklonio sav serum koji bi mogao inhibirati tripsin. Otopina s kojom se ispiralo se baci te se nakon toga doda otopina tripsina u etilendiamintetraoctenoj kiselini. Nakon 15-30 sekundi ukloni se višak tripsina, a stanice se inkubiraju na temperaturi od 37 °C. Zatim se doda prethodno zagrijani stanični medij te se doda serum kako bi se zaustavila aktivnost tripsina. Suspenzija stanica se centrifugira, supernatant se odbaci, a stanice se resuspendiraju u mediju. Repipetiranjem se disagregiraju nakupine stanica te se prikladni alikvoti staničnih suspenzija dodaju u boce za kultivaciju (Vinken i sur., 2016).

## 1.6.2 Caco-2 stanična linija

70ih godina 20. stoljeća izolirano je nekoliko različitih staničnih linija tumora gastrointestinalnog trakta s ciljem istraživanja staničnih mehanizama nastanka tumora te razvoja novih lijekova. Pošto se u gastrointestinalnom traktu nalaze morfološki i funkcionalno vrlo različite stanice poput enterocita, vrčastih stanica, enteroendokrinih stanica, Panethovih stanica te M-stanica javila se potreba za diferencijacijom tumorskih stanica u specifične stanične tipove. Stanična linija Caco-2 stanica (Cancer coli-2) pokazala se kao najbolja opcija zbog mogućnosti da, za razliku od ostalih staničnih linija koje je za poticanje na diferencijaciju bilo potrebno tretirati sintetskim i biološkim agensima, diferencira spontano. Caco-2 stanice izolirao je iz ljudskog kolorektalnog adenokarcinom Jorgen Fogh na institutu pod nazivom Sloan-Kettering Cancer Research Institute. Caco-2 stanice rastu kao adherentni monosloj epitelnih stanica. Nakon što se uspostave standardni uvjeti za njihov normalan rast, potrebno im je oko 14 do 21 dan da diferenciraju u četkaste epitelne stanice s mikrovilima (s apikalne strane) međusobno povezane čvrstim spojevima. Tako diferencirane izlučuju probavne enzime poput peptidaza (aminopeptidaza N, dipeptidilpeptidaza IV) i disaharidaza (laktaza, saharaza-izomaltaza). Od membranskih ionskih transportera sadrže  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPazu,  $\text{H}^+/\text{K}^+$  ATPazu,  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  transporter,  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$  kotransporter te apikalne  $\text{Cl}^-$  kanale, dok od membranskih neionskih transportera sadrže P-glikoprotein, MRP (multidrug resistance-associated protein) te LRP (lung cancer-associated resistance protein). Također sadrže i receptore za vitamin B12, vitamin D3, receptor za epidermalni faktor rasta (EGFR) te transportere za šećere GLUT1, GLUT2, GLUT3, GLUT5 i SGLT1. Uz to imaju sposobnost proizvodnje citokina IL-6, IL-8, IL-15,  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{TGF-}\beta$ 1 i TSLP (thymic stromal lymphopietin) (Verhoeckx i sur., 2015).

Caco-2 stanice najčešće se uzgajaju u mediju pod nazivom RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640) ili alternativno u mediju DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) koji je korišten u ovom ispitivanju. RPMI 1640 sadrži 10% fetalnog goveđeg seruma, 1% neesencijalnih aminokiselina (NEAA), 50  $\mu\text{M}$  tioglicerola i 25 mg/ml gentamicina. Stanice se trebaju čuvati na 37°C u vlažnoj atmosferi koja sadrži 5% ugljikova dioksida. Za razmnožavanje u bocama za kultivaciju stanice se nasađuju u koncentraciji  $10^5$  stanica/cm<sup>2</sup>. Medij je potrebno mijenjati svaka 3 dana. Kada stanice prekriju 80% površine boce za kultivaciju što je obično nakon 4-5 dana stanice se podijele 1:10 prije daljnje kultivacije. Stanice se nakon toga tripsiniziraju na način da se prvo isperu otopinom fosfatnog pufera te im se nakon toga doda otopina tripsina u etilendiamintetraoctenoj kiselini (EDTA). Boce za kultivaciju se



inkubiraju na 37 °C tijekom 6 do 15 minuta. Vrijeme inkubacije trebalo bi biti što kraće kako ne bi došlo do oštećenja i gubitka viabilnosti stanica. Nakon što se stanice u potpunosti dispergiraju, prekine se tripsinizacija te se doda potpuni medij koji sadrži fetalni goveđi serum. Stanice se aspiriraju pažljivim pipetiranjem te se prikladni alikvoti suspenzije stanica prebace u nove boce za kultivaciju. Nakon toga stanice je potrebno prebrojati i provjeriti im viabilnost (broj mrtvih stanica ne smije prelaziti 5%) (Verhoeckx i sur., 2015).

## 2 OBRAZLOŽENJE TEME

Selen je esencijalni element neophodan za normalno funkcioniranje ljudskog organizma. Osim što pokazuje stimulatívne učinke na imunosni sustav, dokazana su i njegova antimikrobna te antitumorska svojstva. Trenutno se na tržištu u dodacima prehrani može naći u različitim organskim i anorganskim oblicima. Kod preniskog unosa selena dolazi do poremećaja niza bioloških procesa u organizmu; s druge strane, unesen u previsokim dozama pokazuje izrazitu toksičnost. Zbog vrlo uskog raspona između djelotvorne i toksične doze sve se više istražuju alternativni oblici koji bi omogućili sigurniju primjenu i bolje terapijske učinke.

Recentna istraživanja pokazuju da selen u obliku nanočestica pokazuje bolju apsorpciju, ciljane učinke te manju toksičnost od klasičnih organskih i anorganskih oblika Se. Uobičajene fizikalno-kemijske metode sinteze nanoselena često uključuju dugotrajne i složene postupke sinteze te zahtijevaju primjenu toksičnih kemikalija. Iz navedenih razloga, naglasak se sve više stavlja na razvoj jednostavnih brzih i zelenih postupaka sinteze korištenjem ekstrakata bilja ili vrijednog otpada iz prehrambene industrije kao izvora prirodnih molekula sa stabilizacijskim i/ili redukcijskim potencijalom. Takav pristup, osim što omogućuje sintezu nanoselena u jednom koraku, pruža mogućnost iskorištavanja prehrambenog otpada i smanjenja njegovog ekološkog otiska. Nadalje, korištenjem kompleksnih prirodnih ekstrakata bogatih bioaktivnim molekulama, moguće je dobiti stabilne nanočestice s proširenim spektrom bioloških učinaka.

Cilj ovog diplomskog rada bio je ispitati svojstva nanočestica selena sintetiziranih postupkom biosinteze uz pektin izoliran iz komine rajčice i mandarine kao sredstva za oblaganje i potencijalno funkcionalizaciju nastalih nanosustava ekstraktom komine masline. Osnovna hipoteza predloženog istraživanja bila je da je s obzirom na fizikalno-kemijska svojstva pektina i bogatstvo polifenolnih komponenti korištenih sirovina moguće sintetizirati stabilne nanosustave s mjerljivim antikancerogenim učinkom na Caco-2 i HepG2 stanične linije. Rezultati provedenog istraživanja pridonjet će trenutnim saznanjima o mogućnostima zelene sinteze nanočestica selena kao i inovativnog iskorištavanja komine rajčice i mandarine kao vrijednih i dostupnih izvora širokog spektra bioaktivnih spojeva.

### 3 MATERIJALI I METODE

#### 3.1 Instrumenti i oprema

- Analitička vaga, AB265-S (Mettler Toledo, Indija)
- Magnetska miješalica, MIX 15 eco (2mag AG, Njemačka)
- Vortex miješalica, tip VTX-3000L (Mixer UZUSIO, Japan)
- Zetasizer Nano ZS (Malvern, Velika Britanija)
- Čitač mikrotitarskih ploča, VICTOR X3 (Perkin Elmer, SAD)
- PC računalo uključujući softvere Microsoft Excel i GraphPad Prism 9
- Dijalizijska membrana, D9527-100FT, MWCO 14 000 Da (Sigma-Aldrich, SAD)
- Syringe filter PES 25 mm 0,45 µm (Agilent Technologies, California, USA)
- Rotavapor (Buchi, Švicarska)
- Invertni mikroskop, (Primovert, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Gottingen, Njemačka)
- Laminar flow uređaj (MSC-Advantage, Thermo scientific)
- Incubator with CO<sub>2</sub> connection (using 5% CO<sub>2</sub> in air) and water-saturated atmosphere for cell culture (MCO-20AIC, Sanyo, Japan)
- Tissue culture flask (25 (Cat. No. 353108), 75 and 150 cm<sup>2</sup> (Cat. No. 355001)
- posuđe i pribor: staklene čaše, pipete (automatske: jednokanalna i multikanalna, staklene), serološke pipete (5, 10, 25 mL), okrugle tikvice s ravnim dnom, Erlenmeyerove tikvice, plastične i metalne žlice, Falcon kivete, plastične štipaljke, mikrotitarska ploča s 96 jažica...

#### 3.2 Kemikalije

- Sirovi i pročišćeni pektini rajčice
- Sirovi i pročišćeni pektini mandarine
- Ekstrakt komine masline
- Askorbinska kiselina (Gram-mol, Hrvatska)
- Natrijev selenit (Sigma-Aldrich, SAD)
- Voda – predestilirana, pročišćena i deionizirana, otpor manji od 18,2 MΩ pri 25 °C i ukupne masene koncentracije organskog ugljika < 5 µg/L
- MEM Nonessential Amino Acids (100x) (Cat. No. NEAA-B; Capricorn Scientific GmbH)

- Antibiotic/Antimycotic solution (100x) (Cat. No. AAS-B; Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD)
- Fetal Bovine serum advanced, Collected in South America Inactivated (Cat. No. FBS-HI-11A; Capricorn Scientific)
- Trypsin (10x) 2.5% in HBSS w/o Ca, Mg, 100 mL (Cat. No. BE17-160E; Lonza, Basel, Švicarska)
- Ethylenediaminetetraacetic acid solution (EDTA), 0.02% in DPBS, 100 mL, (E8008, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD)
- Phosphate Buffer Saline (PBS) without calcium and magnesium PBS-10X, w/o Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup> 1 L LOT: 9MB026 (Cat-No. BE17-517Q, Lonza, Verviers, Belgija)
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) - high glucose with 4500 mg/L glucose, L-glutamine, and sodium bicarbonate, without sodium pyruvate, liquid, sterile-filtered, suitable for cell culture (CP19-3058, Capricorn Scientific)
- L-glutamine 200 mM (G7513, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD)
- Sterile water (ultra clean water obtained by SG Reinstwassersystem Ultra Clear UV Plus coupled with SG Wasservollentsalzer-Patrone SG-2800 (Günzburg, Germany) and autoclaved by Tuttnauer autoclave-steam sterilizer (3150ELC) on the program 5
- Caco-2: Received from Pliva at P59, Date of first thawing: 9.9.2015.
- Minimum Essential Medium Eagle (EMEM) – with Earle's Salts and sodium bicarbonate, without L-glutamine, liquid, sterile-filtered, suitable for cell culture (M2279, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD)
- HepG2: Received from IMI at P10, Date of first thawing: 9.9.2015.
- MTT reagens (3-[4-dimethylthiazole-2-yl]-2,5 diphenyltetrazolium bromide; Carbosynth Limited, Compton, Engleska)
- tert-butyl hydroperoxide (tBOOH), (Sigma Aldrich, St.Louis, USA)
- Dimethylsulphoxide (DMSO) (Carlo Erba, Val-de-Reuil, France)

### 3.2.1 Reagensi i otopine

**Izrada 1 M otopine L-askorbinske kiseline:** U staklenu čašu izvagano je 1,762 g L-askorbinske kiseline te je dodano 10 mL vode i promiješano dok se sva askorbinska kiselina nije otopila. L-askorbinsku kiselinu potrebno je pripremiti svježu prije analize dok se ostale kemikalije mogu pripremiti dan ranije.

**Izrada 0,1 M otopine natrijevog selenita, Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>:** U staklenu čašu izvagano je 172,9 mg natrijevog selenita, Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> te je dodano 10 mL vode i promiješano dok se sav natrijev selenit nije otopio u vodi.

**Izrada 1% otopine ekstrakta komine masline:** Izvagano je 400 mg ekstrakta komine masline i otopljeno u 40 mL vode. Sve zajedno stavljeno je na Vortex miješalicu. Otopina se neposredno prije sinteze profiltrirala kroz HPLC filter veličine 0,45 µm.

**Izrada 0,05 % otopine pektina:** Izvagano je 15 mg pektina direktno u Erlenmeyerovu tikvicu od 100 mL te je dodana potrebna količina vode. Zatim su pektini stavljani na magnetsku miješalicu na 1200 okretaja i ostavljeni preko noći. Drugi dan otopine su prebačene u plastične Falcon kivete od 50 mL i centrifugirane na 3500 rpm 5 min, vorteksirane te ponovno centrifugirane na 3500 rpm 5 min. Naglim pokretom otopine su prebačene u čistu Erlenmeyerovu tikvicu od 50 mL tako da je talog zaostao u plastičnoj Falcon kiveti.

### 3.3 Metode

#### 3.3.1 Sinteza nanoselena s pektinom kao sredstvom za oblaganje

U smjesu pektina i vode dodana je L-askorbinska kiselina i ekstrakt komine masline. Nakon toga kap po kap dodavan je natrijev selenit,  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ , brzinom 1 kap/2 sekunde. Tijekom dodavanja natrijeva selenita otopina je mijenjala boju u crvenu zbog promjene oksidacijskog stanja selena iz +IV u 0 (došlo je do reakcije redukcije ionskog oblika u elementarni selen). Nakon dodatka selenita, otopina se miješala na magnetskoj miješalici još 20 minuta. Potom je reakcijska smjesa prebačena staklenim pipetama od 50 ml u dijalizijske membrane i podvrgnuta procesu čišćenja. Točan sastav reakcijskih smjesa prikazan je u Tablici 2.

**Tablica 2:** Sastav reakcijskih smjesa korištenih u sintezi nanočestica selena

uzorak	$\text{Na}_2\text{SeO}_3$ (0,1 M)/mL	L-ask (1 M)/mL	EKM (1%)/mL	pektin /mg	voda/mL	ukupno/MI
<b>M</b>	1	1	0	15	28	30
<b>R</b>	1	1	0	15	28	30
<b>M<sub>pr</sub></b>	1	1	0	15	28	30
<b>R<sub>pr</sub></b>	1	1	0	15	28	30
<b>M<sub>f</sub></b>	1	1	5	15	23	30
<b>R<sub>f</sub></b>	1	1	5	15	23	30
<b>M<sub>prf</sub></b>	1	1	5	15	23	30
<b>R<sub>prf</sub></b>	1	1	5	15	23	30

M – uzorak sintetiziranog nanoselena uz sirovi pektin mandarine kao sredstvo za oblaganje; R – uzorak sintetiziranog nanoselena uz sirovi pektin rajčice kao sredstvo za oblaganje; M<sub>pr</sub> – uzorak sintetiziranog nanoselena uz pročišćeni pektin mandarine kao sredstvo za oblaganje; R<sub>pr</sub> – uzorak sintetiziranog nanoselena uz pročišćeni pektin rajčice kao sredstvo za oblaganje; M<sub>f</sub> – uzorak sintetiziranog nanoselena uz sirovi pektin mandarine kao sredstvo za oblaganje te uz dodatak ekstrakta komine masline; R<sub>f</sub> – uzorak sintetiziranog nanoselena uz sirovi pektin rajčice kao sredstvo za oblaganje te uz dodatak ekstrakta komine masline; M<sub>prf</sub> – uzorak sintetiziranog nanoselena uz pročišćeni pektin mandarine kao sredstvo za oblaganje te uz dodatak ekstrakta komine masline; R<sub>prf</sub> – uzorak sintetiziranog nanoselena uz pročišćeni pektin rajčice kao sredstvo za oblaganje te uz dodatak ekstrakta komine masline

### 3.3.2 Čišćenje uzoraka dijalizom

Nakon provedene sinteze, smjesa je pročišćena kako bi se neizreagirani reaktanti odvojili od čestica nanoselena. Dijalizijske membrane namočene su u vodi kroz tri do četiri sata kako bi se uklonili tragovi glicerola (voda se u međuvremenu promijenila tri puta). Promjer pora dijalizijskih membrana iznosio je 14 000 što znači da membrane imaju sposobnost zadržavanja svih čestica većih od 14 000 kDa. Kapacitet korištenih membrana iznosi 175 mL/ft odnosno 175 mL/0,305 m (5,8 mL/cm). Nakon uklanjanja tragova glicerola, membrane su izrezane na dijelove dužine 14 cm. Dijelovi su narolani i s jedne strane zakačeni plastičnom štipaljkom. Zatim se u svaku membranu dodalo 30 mL suspenzije novosintetiziranog nanoselena. Membrane su nakon toga zarolane i uhvaćene plastičnom štipaljkom. Dijalizijske membrane su potom zakačene nosačem na rub čaše kako bi sve dijalizacijske vreće bile potpuno uronjene u vodu te jednako udaljene od magnetske miješalice (korišteni su veliki magnetski mješači veličine 1,5 cm). Dijalizati od 30 m uronjeni su u posude volumena 1000 mL (u svaku posudu stavljeno je oko 900 mL vode). Voda je bila mijenjana tri puta i to na način da se prvi puta promijenila nakon 3 sata, drugi puta nakon 5 sati te treći puta nakon noći. S obzirom da su u uzorcima bile vidljive niti pektina koje se nisu u potpunosti otopile, otopine nanoselena prebačene su u plastične Falcon kivete volumena 50 mL i centrifugirane na 3000 okretaja tijekom 10 minuta. Pomoću pipete, pazeći da se ne pokupi istaloženi pektin, otopine nanoselena prebačene su u nove plastične Falcon kivete za daljnja ispitivanja.

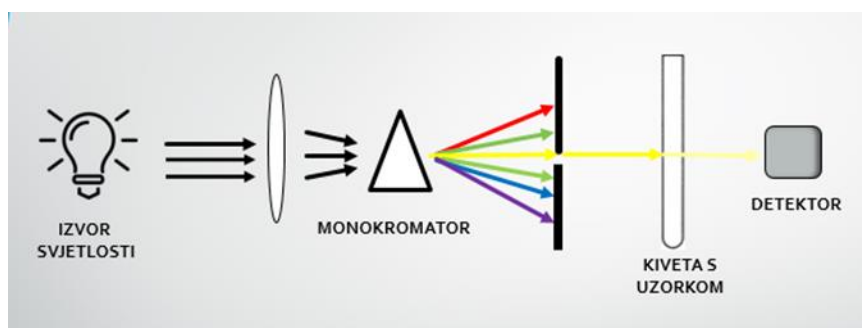
### 3.3.3 UV/VIS spektroskopija

UV/VIS spektroskopija je instrumentalna metoda koja se bavi proučavanjem interakcija ultraljubičaste i vidljive svjetlosti s tekućim ili krutim uzorcima. Ultraljubičasta i vidljiva svjetlost obuhvaćaju raspon energija od 1,5 do 6,2 eV odnosno područje valnih duljina od 800 do 200 nm (Tablica 3). Ultraljubičasta i vidljiva svjetlost pobuđuju valentne elektrone u molekuli odnosno uzrokuju prijelaze iz nižih vibracijskih i rotacijskih stanja elektrona u više. Proces u kojem molekula upija kvant energije zračenja naziva se apsorpcija.

**Tablica 3:** Spektar elektromagnetskog zračenja.

<b>VRSTA EM ZRAČENJA</b>	<b>RASPON VALNIH DULJINA</b>	<b>RASPON FREKVENCIJA (Hz)</b>
<b>gama</b>	$< 10^{-12}$ m	$10^{20} - 10^{24}$
<b>rendgensko</b>	1 nm - 1 pm	$10^{17} - 10^{20}$
<b>ultraljubičasto</b>	200 nm - 1 nm	1015 - 1017
<b>vidljiva svjetlost</b>	800 nm - 400 nm	$4 - 7.5 \times 10^{14}$
<b>infracrveno</b>	25 $\mu\text{m}$ - 2.5 $\mu\text{m}$	$10^{13} - 10^{14}$
<b>mikrovalno</b>	1 mm - 25 $\mu\text{m}$	$3 \times 10^{11} - 10^{13}$
<b>radiovalovi</b>	$> 1$ mm	$< 3 \times 10^{11}$

Spektrofotometar je uređaj koji mjeri apsorbanciju kao funkciju valne duljine svjetlosti. Njime se zapravo mjeri neapsorbirano ili propušteno zračenje odnosno on omogućava usporedbu intenziteta ulaznog zračenja i zračenja nakon što je ono prošlo kroz uzorak. Klasični spektrofotometri sastoje se od izvora zračenja (halogena ili deuterijeva žarulja), monokromatora (razdvaja svjetlost na temelju različitih valnih duljina pomoću optičke rešetke ili prizme), spremnika za uzorke (kivete odnosno posudice paralelnih stijenki), detektora, procesora i uređaja za očitavanje signala.



**Slika 2:** Osnovni dijelovi spektrofotometra.

Osim u kvalitativnoj analizi kojom se određuju različiti kromofori organskih i anorganskih molekula, zahvaljujući Beer-Lambertovom zakonu UV/VIS spektroskopija može se koristiti i u kvantitativnoj analizi. Transmitancija je omjer intenziteta propuštenog zračenja,  $I$  i intenziteta



upadnog zračenja,  $I_0$ . Što je veći broj molekula koje apsorbiraju zračenje to je i veća apsorpcija. Veća apsorpcija je i onda ako molekula učinkovitije apsorbira svjetlo na određenoj valnoj duljini. Iz svega zaključno proizlazi Lambert-Beerov zakon koji kaže da je apsorpcija proporcionalna koncentraciji apsorbirajuće vrste:

$$A = \epsilon bc$$

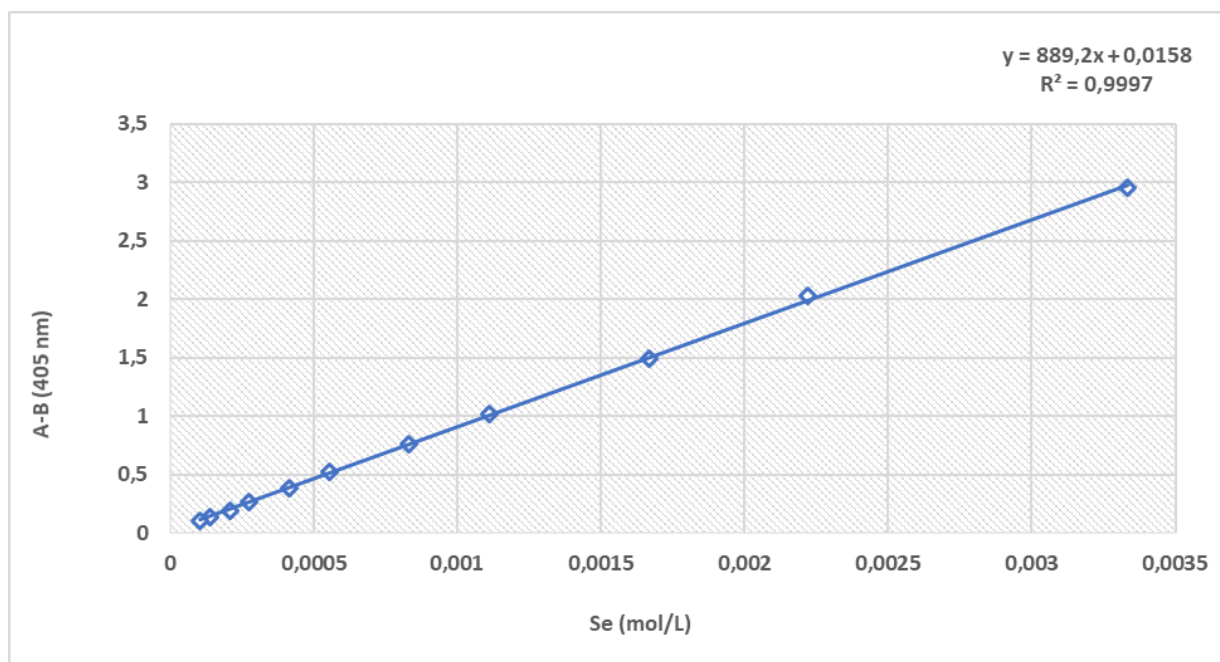
U navedenoj jednadžbi  $A$  predstavlja apsorpciju na određenoj valnoj duljini svjetlosti (nema mjernu jedinicu),  $\epsilon$  označava molarni apsorpcijski (ekstinkcijski) koeficijent izražen u  $L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  ( $\epsilon$  je ovisan o valnoj duljini svjetlosti te je karakterističan za svaku molekulsku vrstu),  $b$  je duljina puta svjetlosti kroz uzorak izražena u  $\text{cm}$ , a  $c$  je koncentracija tvari u otopini izražena u  $\text{mol L}^{-1}$  (<https://chem.libretexts.org/>).

Kako bi se mogla odrediti približna koncentracija novosintetiziranog nanoselena u uzorku, najprije je potrebno izmjeriti apsorpcijski spektar otapala odnosno referentnog uzorka (u ovom slučaju vode), takozvanu baznu liniju. Većina današnjih spektrofotometara omogućava korisniku automatsko oduzimanje bazne linije od spektra mjerenog uzorka. Nakon toga potrebno je izmjeriti apsorpcije uzoraka poznatih koncentracija na temelju kojih se potom konstruira baždarni pravac koji prikazuje ovisnost apsorpcije o koncentraciji nanoselena pri  $\lambda \text{ max}$  (405 nm). Teoretske koncentracije nanoselena u otopinama korištenim za izradu baždarnog pravca prikazane su u Tablici 4. Zatim se odredi jednadžba pravca te se pomoću nje koristeći izmjerenu apsorpciju ispitivanih uzoraka odrede koncentracije novosintetiziranog nanoselena.

**Tablica 4:** Teoretske koncentracije nanoselena u otopinama korištenim za izradu baždarnog pravca

UZORAK	nSe (mol/L)	UZORAK	nSe (mol/L)
1	0,003333	7	0,000417
2	0,002222	8	0,000278
3	0,001667	9	0,000208
4	0,001111	10	0,000139
5	0,000833	11	0,000104
6	0,000555	12	0

\*Teoretske koncentracije nanoselena u ispitivanim otopinama izračunate su na temelju koncentracije natrijevog selenita korištenog u procesu sinteze nanočestica selena uz pretpostavku 100%-tnog iskorištenja reakcije.



**Slika 3:** Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije pri valnoj duljini 405 nm o molarnoj koncentraciji nanočestica selen.

### 3.3.4 Uparavanje nanoselena (izrada stock otopina za pokuse na stanicama)

Nakon provedene dijalize, dijalizati su prebačeni u tikvice za uparavanje i upareni na rotavaporu na volumen 2-3 mL.

### 3.3.5 Određivanje raspodjele veličine nanočestica selen

Koloidi su disperzni sustavi veličine čestica od 1 do 100 nm. Čestice koloida konstantno se kreću u svim smjerovima sudarajući se s molekulama otapala pri čemu dolazi do prijenosa energije. Te nasumične fluktuacije čestica koloida nazvane su Brownovo gibanje (<https://www.britannica.com/>). Dinamičko raspršenje svjetla (eng. dynamic light scattering, DLS), poznato i pod nazivom fotonska korelacijska spektroskopija (PCS) jedna je od najčešćih tehnika za određivanje veličine čestica koloidnih sustava. Tehnika je brza, relativno jednostavna i jeftina, neinvazivna te omogućava pouzdanu procjenu raspona veličina čestica u koloidnom sustavu. Laserski snop monokromatske, koherentne svjetlosti usredotoči se na mali volumen koloidne otopine pri čemu dolazi do raspršenja ulazne svjetlosti te promjene valne duljine. Valna duljina i polarizacija raspršenog svjetla određene su veličinom, oblikom i kompozicijom čestica koloida. Nasumično Brownovo gibanje čestica koloida u suspenziji

uzrokuje fluktuaciju intenziteta raspršenja mjerenog detektorom u vremenu. Analizom tih fluktuacija moguće je dobiti informacije o difuzijskom koeficijentu i veličini čestica. Intenzitet raspršenja uvelike ovisi o veličini čestica. Primjerice čestice veličine 30 nm pokazuju  $10^6$  puta veće raspršenje nego čestice veličine 3 nm (Bryant i Thomas, 1995.; Kim i sur., 2014).

### 3.3.6 Određivanje zeta potencijala nanočestica selena

Stabilnost čestica koloida odnosno u ovom slučaju stabilnost suspenzije nanočestica selena ovisi o električnim svojstvima čestica odnosno o njihovoj sposobnosti da ostanu u raspršenom stanju bez da međusobno agregiraju ili se krenu taložiti. Važno svojstvo koloida, pomoću kojeg se može pratiti stabilnost sustava je zeta elektrokinetički potencijal. Kad je čestica dispergirana, na njezinoj površini formira se električni dvosloj. Unutarnji sloj, poznat i pod nazivom Sternov sloj uglavnom čine ioni suprotnog naboja od naboja koloidne čestice. Iznad Sternovog sloja, s povećanjem udaljenosti od površine čestice koloida slabi elektrostatski učinak te se formira takozvani difuzijski sloj koji se sastoji od iona i jednakog i suprotnog naboja od naboja čestice. Difuzijski sloj, zajedno sa Sternovim slojem čini električni dvosloj. Struktura difuzijskog sloja je dinamična te se mijenja ovisno o uvjetima kao što su pH, ionska jakost te koncentracija. Kada se takav disperzni sustav stavi u električno polje, nabijene čestice kreću se prema suprotno nabijenoj elektrodi (elektroforeza). Unutar difuzijskog sloja nalazi se hipotetička ploha smicanja koja čini granicu između čestice koloida koja se giba i sloja disperznog sredstva u kojem je dispergirana. Električni potencijal na dodirnoj površini čestice i disperznog sredstva naziva se zeta potencijal i označava se s grčkim slovom  $\zeta$  (zeta). Zeta potencijal najčešće se koristi u svrhu određivanja stabilnosti koloidnih sustava. Prema smjernicama za disperzne sustave nanočestica, sustave prema vrijednostima zeta potencijala možemo podijeliti na: vrlo nestabilne (zeta potencijal je  $\pm 0-10$  mV), relativno stabilne (zeta potencijal je  $\pm 10-20$  mV), umjereno stabilne (zeta potencijal je  $\pm 20-30$  mV) te vrlo stabilne (zeta potencijal je  $> \pm 30$  mV). Međutim, važno je naglasiti da iako je zeta potencijal relativno dobar parametar za određivanje stabilnosti koloidnih sustava, on ipak ne daje cjelovitu sliku. Naime, na stabilnost koloidnih sustava osim zeta potencijala utječu i privlačne van der Waalsove sile između čestica (Bhattacharjee, 2016).

### 3.3.7 Ispitivanje citotoksičnosti nanočestica selena na kulturi stanica Caco-2

#### Priprema otopina

U 500 ml DMEM-a (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) dodano je 100 mL fetalnog goveđeg seruma, 5 mL otopine antibiotika (smjesa penicilin/streptomycin/ampicilin), 5 mL MEM neesencijalnih aminokiselina čuvanih na 4°C te 10 mL L-glutamina.

Tripsin je razrijeđen 10x s otopinom EDTA (etilendiamitetraoctene kiseline). DMEM je potrebno čuvati na 4°C, a svi dodaci koji se dodaju u medij čuvaju se na -20°C (poželjno u alikvotima kako bi se izbjegli ciklusi odmrzavanja/zamrzavanja).

#### Odmrzavanje stanica

Alikvoti Caco-2 stanica bili su zamrznuti u tekućem dušiku u mediju za zamrzavanje koji je sadržavao 95% fetalnog goveđeg seruma i 5% DMSO (dimetilsulfoksida). Odmrzavanje se provodilo mućkanjem u vodenoj kupelji na temperaturi od 37°C. Odmrzavanje je bilo potrebno provesti brzo (otprilike 2 minute). Nakon odmrzavanja stanica, svi daljnji postupci bili su provođeni u sterilnim uvjetima. Sadržaj je nakon odmrzavanja premješten u Falcon epruvete koje su sadržavale 5 mL potpunog medija te je centrifugiran na 800 rcf tijekom 3 minute. Nakon toga odbačen je supernatant, a stanice su resuspendirane s 4 mL potpunog medija i prebačene u bocu za kultivaciju površine 25 cm<sup>2</sup>. Kultura stanica potom je inkubirana u uvjetima 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> i 95% vlažnosti zraka.

#### Presadivanje stanica

NAPOMENA: Volumeni reagensa u protokolu dani su za boce za kultivaciju veličine 75 cm<sup>2</sup> te je pri upotrebi drugih veličina potrebno prilagoditi volumene reagensa prema Tablici 5.

Stari medij se uklonio i bacio. Sloj stanica ispran je otopinom pufera 1x (2 x 5 mL) kako bi se uklonili tragovi seruma koji sadrži inhibitor tripsina. Dodano je 2-3 mL otopine tripsina (razrijeđenog 10x s otopinom EDTA) u bocu za kultivaciju te su stanice promatrane pomoću invertnog mikroskopa dok sloj stanica nije bio u potpunosti dispergirani (obično je potrebno oko 5 minuta). Kako bi se izbjegla agregacija važno je ne miješati stanice udaranjem ili potresivanjem boce za kultivaciju prilikom čekanja da se stanice rasprše. Stanice koje se teško

odjeljuju mogu se inkubirati na 37°C kako bi se olakšalo raspršivanje. Potom je dodano 6.0 mL potpunog medija te su stanice aspirirane pažljivim pipetiranjem. Dodani su prikladni volumeni alikvota stanične suspenzije u nove boce za kultivaciju. Preporuča se inokulum od  $1 \times 10^4$  živih stanica/cm<sup>2</sup>. Stanice je bilo potrebno ponovo presaditi kada su prekrile 80% površine boce za kultivaciju pri koncentraciji između  $8 \times 10^4$  i  $1 \times 10^5$  stanica/cm<sup>2</sup>. Preporučeni omjer subkultivacije stanica je od 1:4 do 1:6, ali može biti i do 1:10.

**Tablica 5:** Količina potrebnih reagensa ovisno o veličini boce za kultivaciju.

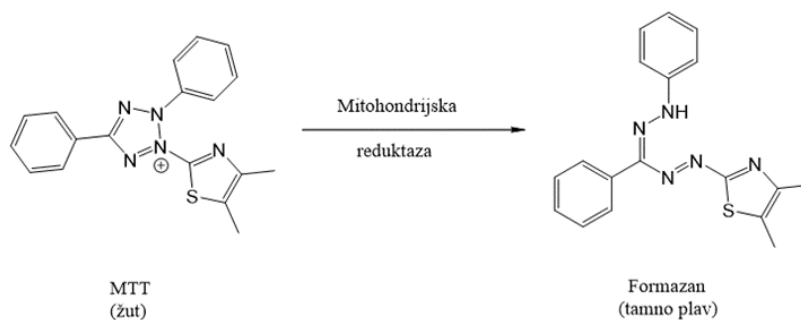
<b>KOLIČINA REAGENSA OVISNO O VELIČINI (cm<sup>2</sup>)</b>			
	<b>25</b>	<b>75</b>	<b>150</b>
<b>DMEM potpuni medij (mL)</b>	4	12	24
<b>PBS (mL)</b>	2x2	2x5	2x10
<b>TRIPSIN 1x (mL)</b>	1,5	4	8

### 3.3.8 Ispitivanje citotoksičnosti nanočestica selena na kulturi stanica HepG2

Postupci pripreme otopina, odmrzavanja i presađivanja stanica prilikom ispitivanja citotoksičnosti na staničnoj kulturi HepG2 identični su kao i oni opisani kod ispitivanja citotoksičnosti na staničnoj kulturi Caco-2 uz iznimku da se kao stanični medij za uzgoj HepG2 stanica ne koristi DMEM-a (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) već EMEM (Minimum Essential Medium Eagle).

### 3.3.9 Kolorimetrijsko određivanje metaboličke aktivnosti stanica

MTT metoda je kolorimetrijska metoda za određivanje metaboličke aktivnosti stanica. Enzimi NAD(P)H-ovisne stanične oksidoreduktaze mogu u određenim okolnostima indicirati na broj živih stanica. Ti enzimi mogu reducirati tetrazolijsku boju MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolij bromid) koja je žute boje u netopljivi formazan koji je tamno plav (Slika 4). Mjerenjem apsorbancije na određenoj valnoj duljini (najčešće između 500 i 600 nm) može se odrediti količina nastalog formazana. Što je veća koncentracija formazana, otopina je intenzivnije ljubičaste boje te je vrijednost apsorbancije veća. Također, veća koncentracija formazana ukazuje na veću viabilnost stanica (Präbst i sur., 2017).



**Slika 4:** Reakcija redukcije MTTa u formazan.

### 3.3.9.1 Nasađivanje ploča s 96 jažica (2 dana prije tretmana)

Tikvica površine 150 cm<sup>2</sup> je tripsinizirana. Potom je pelet stanica resuspendiran u 20 mL za brojanje stanica (moguće je i u većem volumenu da se stanice lakše broje, međutim pritom se mora paziti da se ne razrijedi previše s obzirom na željenu koncentraciju stanične suspenzije). Za brojanje je uzeto 50 µL suspenzije (koristi se žuti objektiv, srednji okular). Stanice su izbrojane i ukupan broj stanica podijeljen je s brojem kvadranta (8). Dobiveni broj pomnožen je s 10 000 te je dobivena koncentracija,  $c_0$  [stanica/mL]. U ovom ispitivanju pripremljena je stanična suspenzija koncentracije 20 000 stanica/jažica odnosno 200 000 stanica po mL (u jažice se pipetiralo po 100 µL stanične suspenzije; 20 000 st./jažica = 200 000 st./mL). Zatim je bilo potrebno izračunati koliki je volumen te koncentracija stanica potrebna (npr. 3 ploče x oko 100 jažica je 300 jažica x 0,1 mL st. suspenzije = 30 mL, no bilo je potrebno napraviti malo više (35 mL) kako bi se moglo lakše pipetirati zbog pjenjenja stanične suspenzije). Nakon toga, stanična suspenzija ispipetirana je na cijelu ploču pomoću multikanalne pipete, iako su za pokus korištene samo unutarnje jažice (jedan stupac je ostavljen prazan i umjesto stanične suspenzije dodan je PBS - blank). Suspenzija se konstantno miješala u lađici pazeći da se ne prolije. Nasađene stanice puštene su na ploči 2 dana da postignu konfluentnost.

### 3.3.9.2 Tretman stanica

Medij je aspiriran te je potom dodano 90 µL svježeg medija. Dodano je 10 µL uzoraka u različitim koncentracijama u kvadriplikatu. Stanice su inkubirane s uzorcima razrijeđenima PBS-om (ukoliko su nepoznate interferencije uzorka i PBS-a razrijediti se moglo i u vodi) preko noći na 37 °C/5% CO<sub>2</sub>. Na ploču osim uzoraka dodana je i negativna kontrola (u ovom slučaju PBS, a negativna kontrola mogla je biti i voda kada bi se u njoj razrijedio uzorak) i pozitivna kontrola (prooksidans tert-butil hidroperoksid, tBOOH finalne koncentracije 500 µM u jažici).

### 3.3.9.3 MTT pokus (3 dana od nasadivanja ploča)

Pripremljen je MTT reagens (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid, Compton, Engleska) koncentracije 0,5 mg/mL u PBS-u. Potom je izračunat potreban volumen MTT reagensa s obzirom na broj jažica (40 µL po jažici). Nakon toga uklonjen je medij, a ispiranje je provođeno s 100 µL PBS 1x/jažici. Dodano je 40 µL MTT reagensa koncentracije 0,5 mg/mL u PBS-u. S početkom pipetiranja MTT reagensa na prvu ploču, počelo se mjeriti vrijeme. Ukupno vrijeme inkubacije bilo je 3 h u inkubatoru (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% vlažnost). Pokus je bilo potrebno provoditi u mraku zbog osjetljivosti MTT reagensa na svjetlost. Kao otapalo za nastali formazan, dodano je 170 µL DMSO (dimetilsulfoksida) u jažice. Ploča je stavljena na tresilicu da se ljubičasti kristalići formazana otope (otprilike 30 minuta) i potom je prekrivena folijom. Nakon što je izmjerena apsorbancija na 530 nm, DMSO se pipetom odbacio u organski otpad.

### 3.3.10 Određivanje IC<sub>50</sub>

Kao što je navedeno u uvodu, primjena nanočestica u medicinske svrhe, osim brojnih prednosti, sa sobom donosi brojne rizike te uzrokuje zabrinutosti u znanstvenim krugovima. Iz tog razloga, prije stavljanja na tržište potrebno je provesti brojna toksikološka ispitivanja i ispitivanja učinkovitosti. Zbog etičkog problema ispitivanja lijekova na životinjama, in vitro metode u dosadašnjim istraživanjima pokazale su se kao dobra alternativa za testiranje toksičnosti nanočestica. Jedna od metoda koja se pokazala uspješnom u identifikaciji potencijalnih toksičnih učinaka nanočestica zbog akumulacije u tkivima je mjerenje IC<sub>50</sub>. IC<sub>50</sub> vrijednost predstavlja polovicu maksimalne inhibitorne koncentracije odnosno dozu lijeka (u ovom slučaju nanočestica selena) koja uzrokuje 50% inhibicije kod specifične populacije (u ovom slučaju kod staničnih linija HepG2 i Caco-2) nakon određenog vremena. U kontekstu primjene nanočestica kao protutumorskih lijekova i ispitivanja njihove antikancerogene aktivnosti, IC<sub>50</sub> ukazuje na sposobnost nanočestica da inhibiraju rast tumorskih stanica kao i na toksične učinke koje uzrokuju na zdravim stanicama (González-Larrazza i sur., 2020).

U ovom radu antikancerogena aktivnost nanočestica selena na staničnim linijama HepG2 i Caco-2 određena je pomoću MTT testa na temelju količine nastalog produkta formazana (mjerenjem apsorbancije na 530 nm) nakon tretmana stanica s uzorcima novosintetiziranog

nanoselena. Početna koncentracija nanoselena u uzorcima određena je mjerenjem apsorbancije uz pomoć baždarnog pravca. Kako bi se mogao odrediti IC<sub>50</sub>, izračunat je logaritam koncentracija uzoraka i postotak inhibicije (POI, percentage of inhibition) izražen u postotku prema formulama:

$$\% = (A - A_{\text{blank}}) / (A_{\text{ctr}} - A_{\text{blank}}) * 100$$

gdje je blank samo boja bez stanica, a negativna kontrola netretirane stanice u koje je dodana voda umjesto uzorka.

$$\text{POI} = ( \% - \%_{\text{ctr-}} ) / ( \%_{\text{ctr+}} - \%_{\text{ctr-}} ) * 100$$

gdje su pozitivna kontrola stanice tretirane s 500 μM prooksidansa tBOOH koji djeluje toksično na stanice. Iz provedenog MTT testa i navedenih formula izračunate su IC<sub>50</sub> vrijednosti analiziranih uzoraka.

### 3.3.11 STATISTIČKA ANALIZA

Sve analize su provedene u četveroplikatu. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija paralelnih određivanja. Dobivene vrijednosti uspoređene su provođenjem jednosmjerne analize varijance i pot hoc Tukey testa. Za obradu podataka korišteni su programski paketi Excell (Microsoft Office) i GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software LLC).



## **4 REZULTATI I RASPRAVA**

### **4.1 RELATIVNA KONCENTRACIJA NANOČESTICA SELENA**

Relativne koncentracije nanoselena u uzorcima određene su mjerenjem apsorbancija razrijeđenih uzoraka (10x) na valnoj duljini od 405 nm uz korištenje baždarnog dijagrama ( $y=889,2x+0,0158$ ). Sva mjerenja rađena su u četverplikatu te su od izmjerenih apsorbancija oduzete apsorbancije slijepe probe.

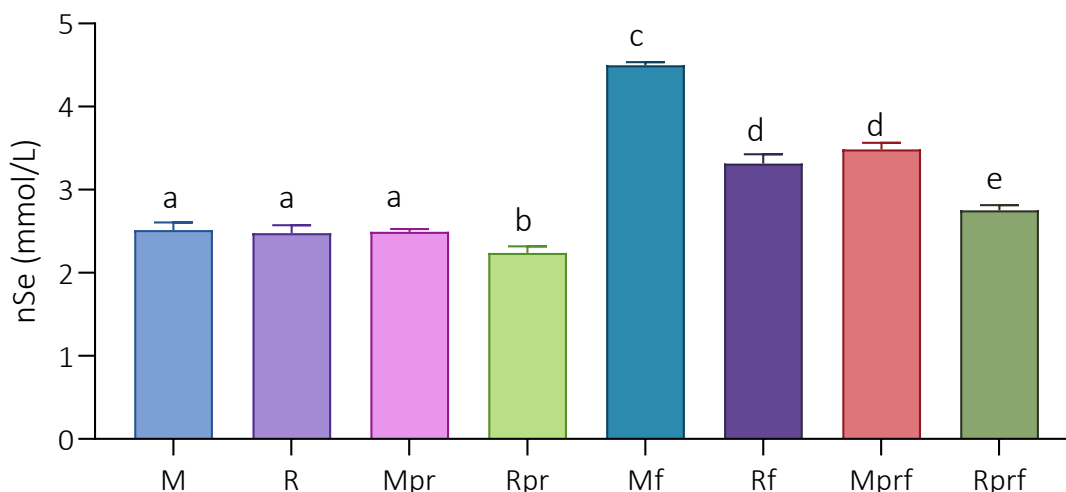
Dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 6. Raspon izračunatih koncentracija novosintetiziranog nanoselena u uzorcima kretao se od 2,2 mmol/L do 4,5 mmol/L. Najmanja koncentracija novosintetiziranog nanoselena uočena je u uzorku nanoselena sintetiziranog uz pročišćeni pektin rajčice kao sredstvo za oblaganje (Rpr), dok je najveću koncentraciju novosintetiziranog nanoselena pokazivao uzorak nanoselena sintetiziran uz pektin mandarine kao sredstvo za oblaganje uz dodatak ekstrakta komine masline. Iz koncentracija prikazanih u tablici može se uočiti i da uzorci kojima je prilikom sinteze dodan ekstrakt komine masline pokazuju veće koncentracije od onih koji su sintetizirani bez dodatka ekstrakta komine masline.

**Tablica 6:** Relativne koncentracije nanoselena u analiziranim uzorcima.

<b>uzorak</b>	<b>nSe (mmol/L)</b>	<b>st. dev. (mmol/L)</b>	<b>RSD</b>
<b>M</b>	2,52	0,09	3,66
<b>R</b>	2,48	0,10	3,94
<b>Mpr</b>	2,49	0,04	1,45
<b>Rpr</b>	2,24	0,08	3,62
<b>Mf</b>	4,50	0,04	0,79
<b>Rf</b>	3,31	0,11	3,39
<b>Mprf</b>	3,48	0,08	2,33
<b>Rprf</b>	2,75	0,06	2,31

M – uzorak sintetiziranog nanoselena uz sirovi pektin mandarine kao sredstvo za oblaganje; R – uzorak sintetiziranog nanoselena uz sirovi pektin rajčice kao sredstvo za oblaganje; Mpr – uzorak sintetiziranog nanoselena uz pročišćeni pektin mandarine kao sredstvo za oblaganje; Rpr – uzorak sintetiziranog nanoselena uz pročišćeni pektin rajčice kao sredstvo za oblaganje; Mf – uzorak sintetiziranog nanoselena uz sirovi pektin mandarine kao sredstvo za oblaganje te uz dodatak ekstrakta komine masline; Rf – uzorak sintetiziranog nanoselena uz sirovi pektin rajčice kao sredstvo za oblaganje te uz dodatak ekstrakta komine masline; Mprf – uzorak sintetiziranog nanoselena uz pročišćeni pektin mandarine kao sredstvo za oblaganje te uz dodatak ekstrakta komine masline; Rprf – uzorak sintetiziranog nanoselena uz pročišćeni pektin rajčice kao sredstvo za oblaganje te uz dodatak ekstrakta komine masline

Statističkom analizom (prikazanom grafički na Slici 5) utvrđeno je da se relativne koncentracije nanoselena uzoraka sintetiziranih uz sirovi ili pročišćeni pektin mandarine te sirovi pektin rajčice ne razlikuju značajno. Također, ne postoji statistički značajna razlika između relativnih koncentracija nanoselena uzorka sintetiziranog uz sirovi pektin rajčice i uz dodatak ekstrakta komine masline te uzorka sintetiziranog uz pročišćeni pektin mandarine i uz dodatak ekstrakta komine masline. Dobivene relativne koncentracije nanoselena svih drugih uzoraka statistički se značajno razlikuju. Relativna koncentracija nanoselena dobivena uz sirovi pektin mandarine kao sredstvo za oblaganje te uz dodatak ekstrakta komine masline mnogo je veća od relativnih koncentracija uzoraka sintetiziranih uz sirovi ili pročišćeni pektin mandarine i rajčice.



**Slika 5:** Koncentracije nanoselena u analiziranim uzorcima.

\*Podaci u analizirani primjenom jednodjerne ANOVA uz post hoc Tukey test. Stupići označeni različitim slovima međusobno se značajno razlikuju ( $p < 0.05$ ).

M – uzorak sintetiziranog nanoselena uz sirovi pektin mandarine kao sredstvo za oblaganje; R – uzorak sintetiziranog nanoselena uz sirovi pektin rajčice kao sredstvo za oblaganje; Mpr – uzorak sintetiziranog nanoselena uz pročišćeni pektin mandarine kao sredstvo za oblaganje; Rpr – uzorak sintetiziranog nanoselena uz pročišćeni pektin rajčice kao sredstvo za oblaganje; Mf – uzorak sintetiziranog nanoselena uz sirovi pektin mandarine kao sredstvo za oblaganje te uz dodatak ekstrakta komine masline; Rf – uzorak sintetiziranog nanoselena uz sirovi pektin rajčice kao sredstvo za oblaganje te uz dodatak ekstrakta komine masline; Mprf – uzorak sintetiziranog nanoselena uz pročišćeni pektin mandarine kao sredstvo za oblaganje te uz dodatak ekstrakta komine masline; Rprf – uzorak sintetiziranog nanoselena uz pročišćeni pektin rajčice kao sredstvo za oblaganje te uz dodatak ekstrakta komine masline

Dobiveni rezultati u skladu su s očekivanjima te s dostupnim literaturnim podacima koji pokazuju da se biljni ekstrakti mogu koristiti u svrhu sinteze metalnih nanočestica (Korde i sur., 2020). Ekstrakt komine masline bogat je sekoiridoidima (tirosoolom, hidroksitirosoolom, oleuropeinom itd.) (Čepo i sur., 2018) koji imaju značajan redukcijski potencijal te na taj način doprinose stvaranju elementarnog selena tijekom procesa sinteze.

#### 4.2 RASPODJELA VELIČINE NANOČESTICA SELENA

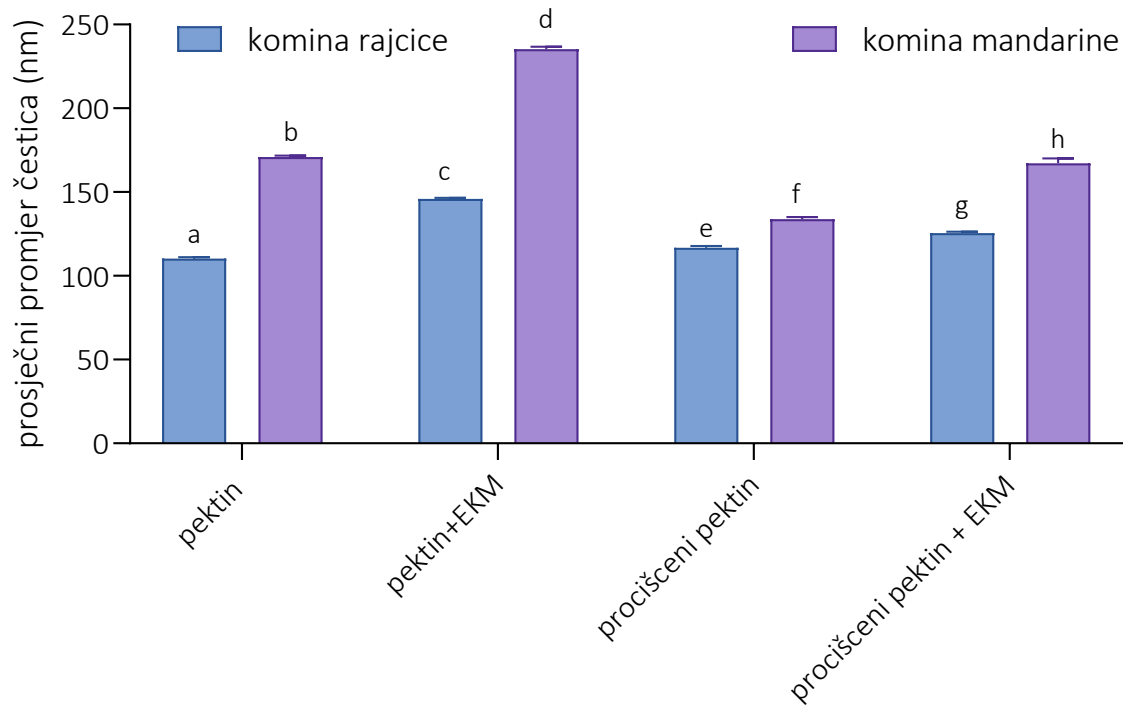
Prosječna veličina novosintetiziranih nanočestica selena prikazana je na Slici 6. Dobivene vrijednosti kretale su se od 110,4 nm do 235,4 nm. Najmanju veličinu imale su nanočestice selena dobivene postupkom sinteze s pektinima rajčice kao sredstvom za oblaganje, dok su

najveće bile nanočestice dobivene postupkom sinteze uz pektin mandarine kao sredstvo za oblaganje te uz dodatak ekstrakta komine masline. Nanočestice sintetizirane uz pomoć sirovog pektina mandarine veće su od onih sintetiziranih uz pomoć sirovog pektina rajčice. Ista analogija može se uočiti i kod postupaka sinteze s pročišćenim pektinima. Također uzorci kojima je prilikom sinteze dodan ekstrakt komine masline imali su veće čestice od uzoraka sintetiziranih na isti način bez dodatka ekstrakta komine masline. Statističkom analizom prikazanom na Slici 6 može se vidjeti da se veličine čestica svih uzoraka sintetiziranih na različite načine statistički značajno razlikuju.

Rezultati određivanja raspodjele veličine čestica pokazuju da je dobivena unimodalna raspodjela veličine čestica te je na dobivenim grafičkim prikazima (Slika 7 i Slika 8) vidljiv jedan pik što upućuje na to da su se metoda sinteze nanočestica selena uz pomoć pektina rajčice i mandarine kao sredstva za oblaganje te metoda čišćenja uzoraka dijalizom pokazale uspješnim. Naime, unimodalna raspodjela veličine nanočestica ukazuje na bolju kvalitetu uzoraka te omogućuje smislenu i utemeljeno povezivanje bioloških učinaka nanočestica s njihovim fizikalno-kemijskim svojstvima.

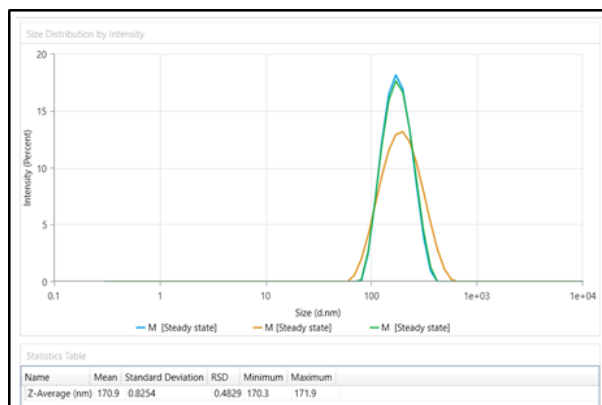
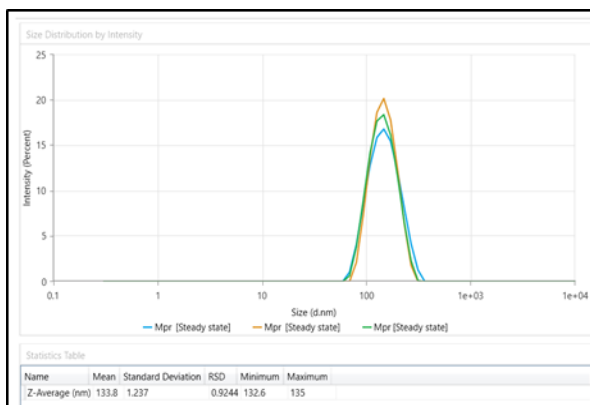
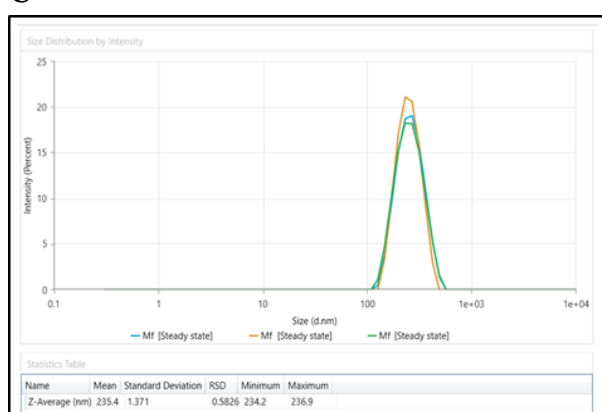
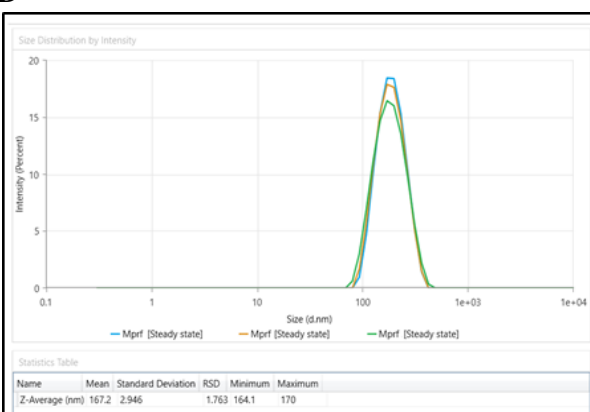
Općenito, prema dostupnoj literaturi, nanočestice selena manje od 100 nm češće pokazuju toksičnije učinke nego veće čestice. Razlog tome je veći broj čestica po jedinici mase i njihova veća površina koja pokazuje veću reaktivnost te dovodi do pojačanog stvaranja reaktivnih kisikovih vrsta. Također, manje čestice lakše prolaze kroz stanične membrane i ulaze u stanicu. Nasuprot tome veće čestice sklonije su stvaranju agregata te su podložnije fagocitozi od strane makrofaga (Kapur i sur., 2017).

Prema rezultatima prikazanim na Slikama 6, 7 i 8 biosintezom pomoću pektina rajčice i mandarine kao sredstava za oblaganje dobivene su čestice veće od 100 nm odnosno čestice povoljnog sigurnosnog profila s obzirom da se kao prag toksičnosti nanočestica često uzima 100 nm (Kapur i sur., 2017).



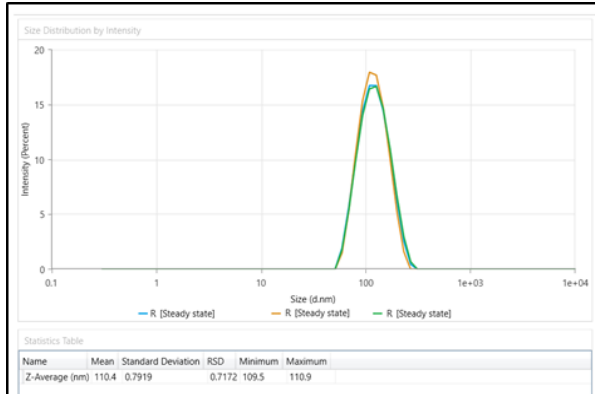
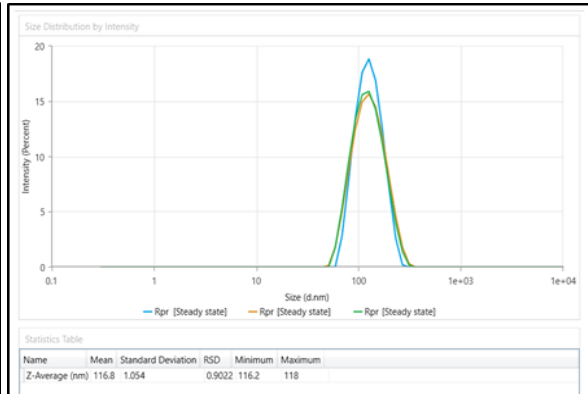
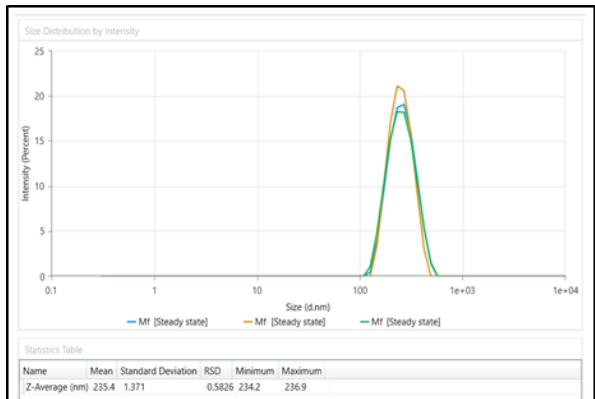
**Slika 6:** Raspodjela veličine nanočestica selena u analiziranim uzorcima

\*Podaci u analizirani primjenom jednodjerne ANOVA uz post hoc Tukey test. Stupići označeni različitim slovima međusobno se značajno razlikuju ( $p < 0.05$ ).

**A****B****C****D**

**Slika 7:** Raspodjela veličine čestica nanoselena stabilizirane pektinima komine mandarine

**A** – nanoselen sintetiziran uz sirovi pektin mandarine kao sredstvo za oblaganje; **B** – nanoselen sintetiziran uz pročišćeni pektin mandarine kao sredstvo za oblaganje; **C** – nanoselen sintetiziran uz sirovi pektin mandarine kao sredstvo za oblaganje te uz dodatak ekstrakta komine masline; **D** – nanoselen sintetiziran uz pročišćeni pektin mandarine kao sredstvo za oblaganje te uz dodatak ekstrakta komine masline

**E****F****G****H**

### Slika 8: Raspodjela veličine čestica nanoselena stabilizirane pektinima komine rajčice

**E** – nanoselen sintetiziran uz sirovi pektin rajčice kao sredstvo za oblaganje; **F** – nanoselen sintetiziran uz pročišćeni pektin rajčice kao sredstvo za oblaganje; **G** – nanoselen sintetiziran uz sirovi pektin rajčice kao sredstvo za oblaganje te uz dodatak ekstrakta komine masline; **H** – nanoselen sintetiziran uz pročišćeni pektin rajčice kao sredstvo za oblaganje te uz dodatak ekstrakta komine masline

Prosječna veličina nanočestica dobivenih sintezom uz pomoć prirodnih biljnih ekstrakata ovisi o vrsti korištenog ekstrakta i drugim uvjetima sinteze. Gunti i suradnici (2019) su korištenjem ekstrakta biljke *Embilica officinalis* dobili nanočestice selena raspona veličina 20-60 nm). Sinteza nanoselena korištenjem ekstrakta gloga rezultirala je nanosustavima prosječne veličine 113 nm (Cui i sur., 2018) dok je veličina čestica nanoselena dobivenih korištenjem ekstrakta *Aloa vera* varirao 121-3243 nm, ovisno o uvjetima sinteze (Fardsadegh i sur., 2019).

Ciljana veličina nanosustava ovisi o konačnoj namjeni. Ukoliko nanočestice selena razmatramo kao moguću formulaciju za peroralnu suplementaciju onda bi te čestice trebale zadovoljiti uvijete niske toksičnosti (>100 nm) i zadovoljavajuće oralne bioraspodjelivosti (<150 nm). U tom kontekstu, sve nanočestice stabilizirane pektinima komine rajčice pokazuju zadovoljavajuć raspon veličine čestica.

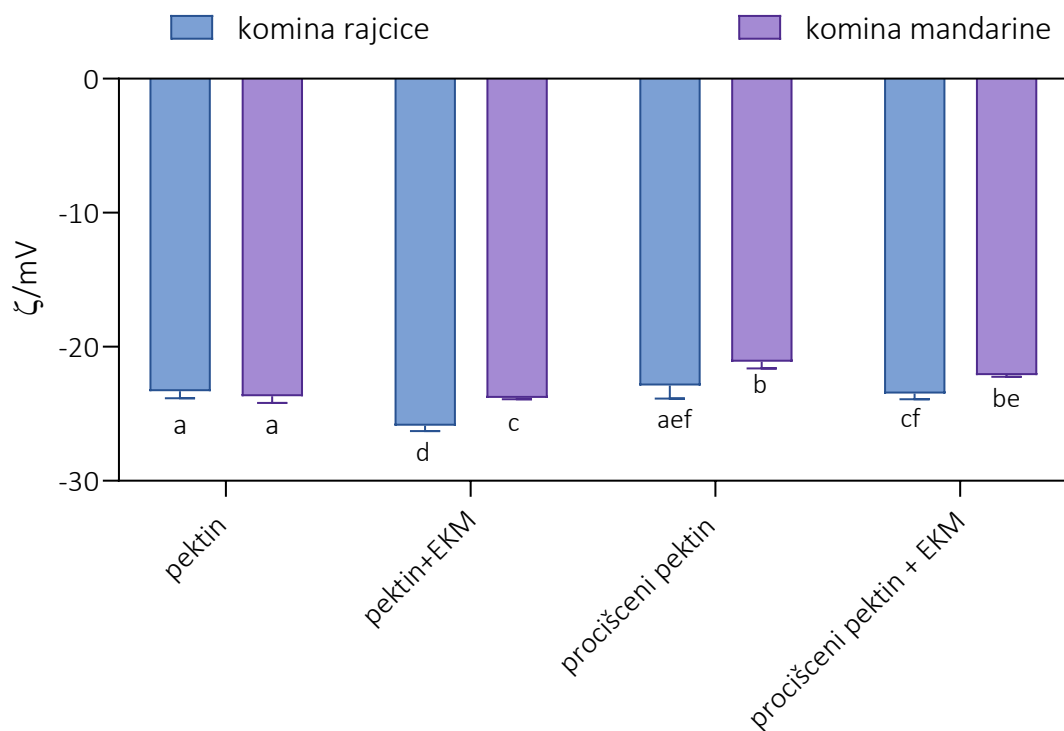
### 4.3 ZETA POTENCIJAL NANOČESTICA SELENA

Kao što je već spomenuto, prema smjernicama za disperzne sustave nanočestica, sustave prema vrijednostima zeta potencijala možemo podijeliti na: vrlo nestabilne (zeta potencijal je  $\pm 0-10$  mV), relativno stabilne (zeta potencijal je  $\pm 10-20$  mV), umjereno stabilne (zeta. potencijal je  $\pm 20-30$  mV) te vrlo stabilne (zeta potencijal je  $> \pm 30$  mV) (Bhattacharjee, 2016).

Zeta potencijali čestica novosintetiziranog nanoselena kretali su se od -25,9 mV do -21,1 mV. Iz navedenog slijedi da su svi sustavi nanočestica selena dobiveni biološkom sintezom uz pomoć pektina rajčice i mandarine kao sredstva za oblaganje stabilni te da se navedena metoda sinteze u tom kontekstu pokazala uspješnom. Najnegativniji zeta potencijal pokazao je uzorak nanoselena sintetiziranog uz pektin rajčice kao sredstvo za oblaganje te uz dodatak ekstrakta komine masline i kao takav predstavlja najstabilniji sustav. S druge strane, najmanje negativan zeta potencijal pokazao je uzorak sintetiziranog nanoselena uz pročišćeni pektin mandarine kao sredstvo za oblaganje što može ukazivati na manju stabilnost sustava.

Na Slici 9 prikazane su srednje vrijednosti zeta potencijala analiziranih uzoraka te su iz oznaka podataka vidljive statističke razlike između pojedinih uzoraka. Uzorci sintetizirani uz sirove pektine rajčice i mandarine pokazuju podjednak zeta potencijal, dok uzorci sintetizirani uz pročišćene pektine rajčice pokazuju negativnije vrijednosti što ukazuje na veću stabilnost u odnosu na uzorke sintetizirane pročišćenim pektinima mandarine. Također uzorci sintetizirani uz sirove i pročišćene pektine rajčice uz dodatak ekstrakta komine masline značajno su stabilniji od uzoraka sintetiziranih na isti način uz pektin mandarine kao sredstvo za oblaganje.





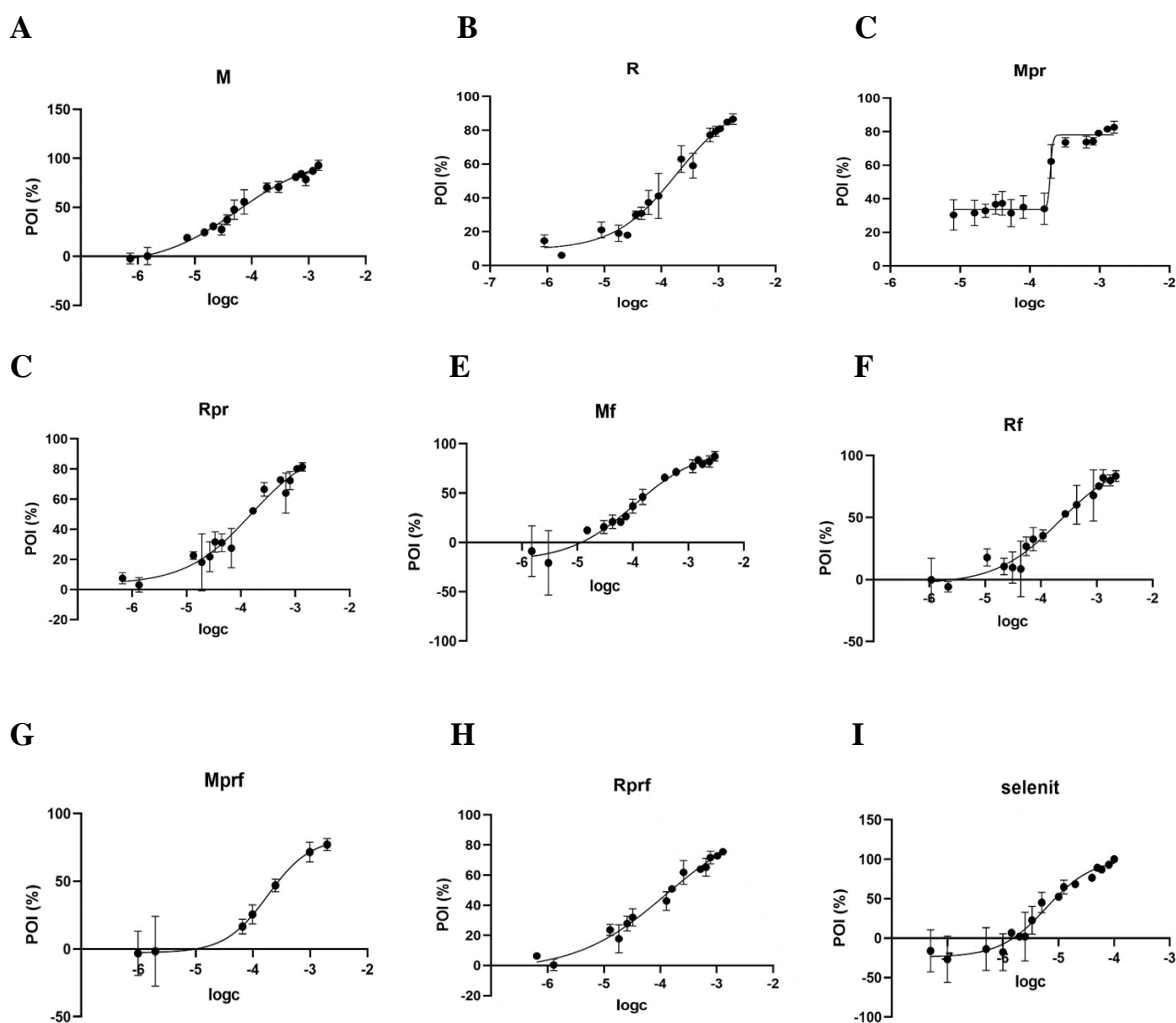
**Slika 9:** Zeta potencijala nanočestica selena.

\* Podaci u analizirani primjenom jednodjerne ANOVA uz post hoc Tukey test. Stupići označeni različitim slovima međusobno se značajno razlikuju ( $p < 0.05$ ).

Bitno je napomenuti da i nanočestice manje negativnog zeta potencijala mogu tvoriti stabilan sustav ukoliko korišteno sredstvo za oblaganje posjeduje mogućnost stvaranja steričkih interakcija. S obzirom na fizikalno-kemijska svojstva pektina, moguće je da stabilizaciju sustava postižu kombinacijom steričkog oblaganja i elektrostatskih interakcija te da će i sustavi s manjim vrijednostima zeta potencijala pokazati zadovoljavajuću stabilnost. Dobiveni rezultati u skladu su s ostalim dostupnim istraživanjima selenovih nanočestica dobivenih sintezom uz primjenu biljnih ekstrakata gdje su se vrijednosti zeta potencijala nanosustava kretale uglavnom od -14 do -24,5 mV (Melinas i sur., 2019; Cui i sur., 2018).

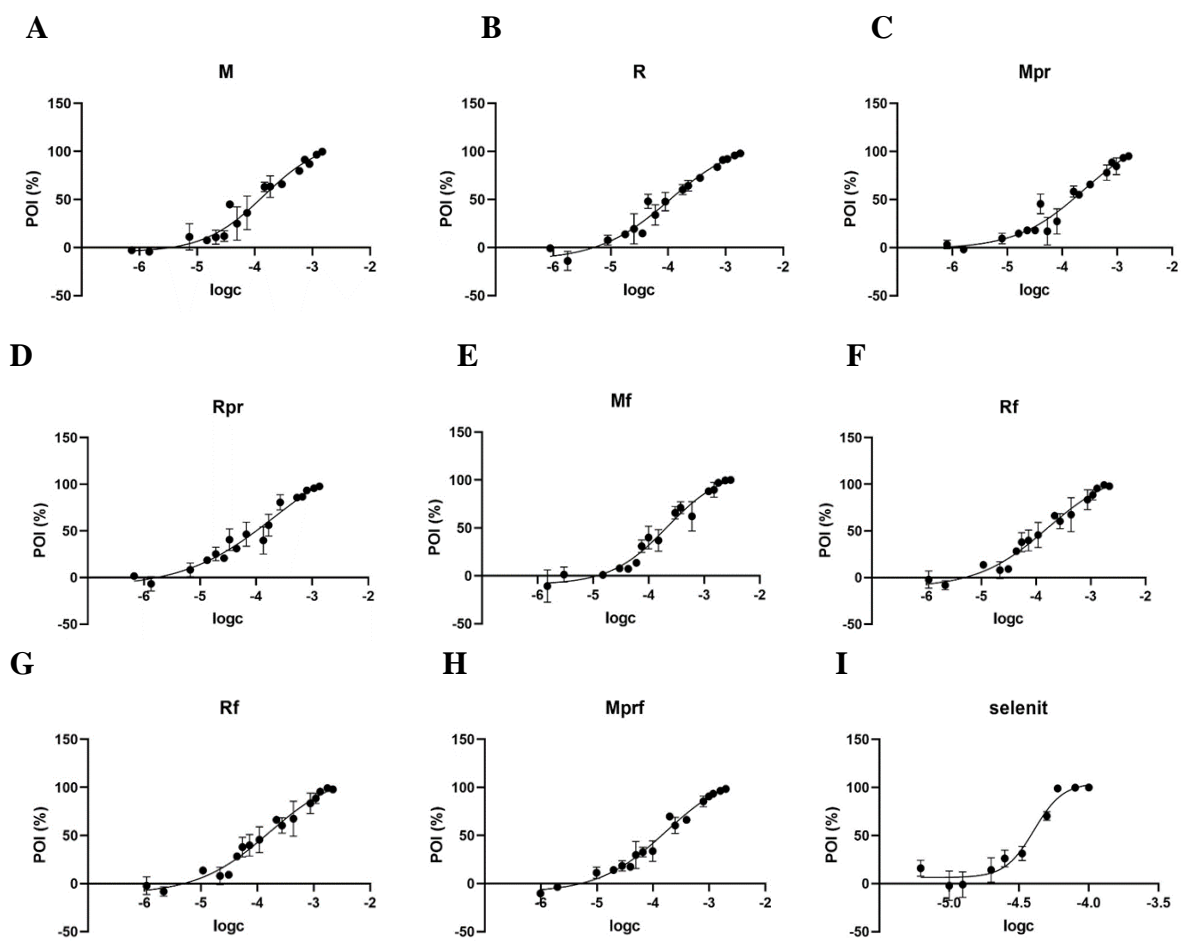
#### 4.4 ANTIKANCEROGENA AKTIVNOST NANOČESTICA SELENA

U svrhu utvrđivanja antikancerogene aktivnosti nanočestica selena, stanične linije HepG2 i Caco-2 tretirane su otopinama uzoraka (M, R, Mpr, Rpr, Mf, Rf, Mprf i Rprf) te otopinom selenita u rasponima koncentracija  $10^{-2}$ - $10^{-6}$  ppm.



**Slika 10:** Ovisnost postotka inhibicije (POI) o logaritmu koncentracije nanoselena u različitim uzorcima za staničnu liniju HepG2.

M – uzorak sintetiziranog nanoselena uz sirovi pektin mandarine kao sredstvo za oblaganje; R – uzorak sintetiziranog nanoselena uz sirovi pektin rajčice kao sredstvo za oblaganje; Mpr – uzorak sintetiziranog nanoselena uz pročišćeni pektin mandarine kao sredstvo za oblaganje; Rpr – uzorak sintetiziranog nanoselena uz pročišćeni pektin rajčice kao sredstvo za oblaganje; Mf – uzorak sintetiziranog nanoselena uz sirovi pektin mandarine kao sredstvo za oblaganje te uz dodatak ekstrakta komine masline; Rf - uzorak sintetiziranog nanoselena uz sirovi pektin rajčice kao sredstvo za oblaganje te uz dodatak ekstrakta komine masline; Mprf – uzorak sintetiziranog nanoselena uz pročišćeni pektin mandarine kao sredstvo za oblaganje te uz dodatak ekstrakta komine masline; Rprf – uzorak sintetiziranog nanoselena uz pročišćeni pektin rajčice kao sredstvo za oblaganje te uz dodatak ekstrakta komine masline; POI-postotak inhibicije inicijalne apsorbancije ( $t=0$ ); c-koncentracija SeNP.



**Slika 11:** Ovisnost postotka inhibicije (POI) o logaritmu koncentracije nanoselena u različitim uzorcima za staničnu liniju Caco2.

M – uzorak sintetiziranog nanoselena uz sirovi pektin mandarine kao sredstvo za oblaganje; R – uzorak sintetiziranog nanoselena uz sirovi pektin rajčice kao sredstvo za oblaganje; Mpr – uzorak sintetiziranog nanoselena uz pročišćeni pektin mandarine kao sredstvo za oblaganje; Rpr – uzorak sintetiziranog nanoselena uz pročišćeni pektin rajčice kao sredstvo za oblaganje; Mf – uzorak sintetiziranog nanoselena uz sirovi pektin mandarine kao sredstvo za oblaganje te uz dodatak ekstrakta komine masline; Rf - uzorak sintetiziranog nanoselena uz sirovi pektin rajčice kao sredstvo za oblaganje te uz dodatak ekstrakta komine masline; Mprf – uzorak sintetiziranog nanoselena uz pročišćeni pektin mandarine kao sredstvo za oblaganje te uz dodatak ekstrakta komine masline; Rprf – uzorak sintetiziranog nanoselena uz pročišćeni pektin rajčice kao sredstvo za oblaganje te uz dodatak ekstrakta komine masline; POI-postotak inhibicije inicijalne apsorpcije ( $t=0$ ); c- koncentracija SeNP.

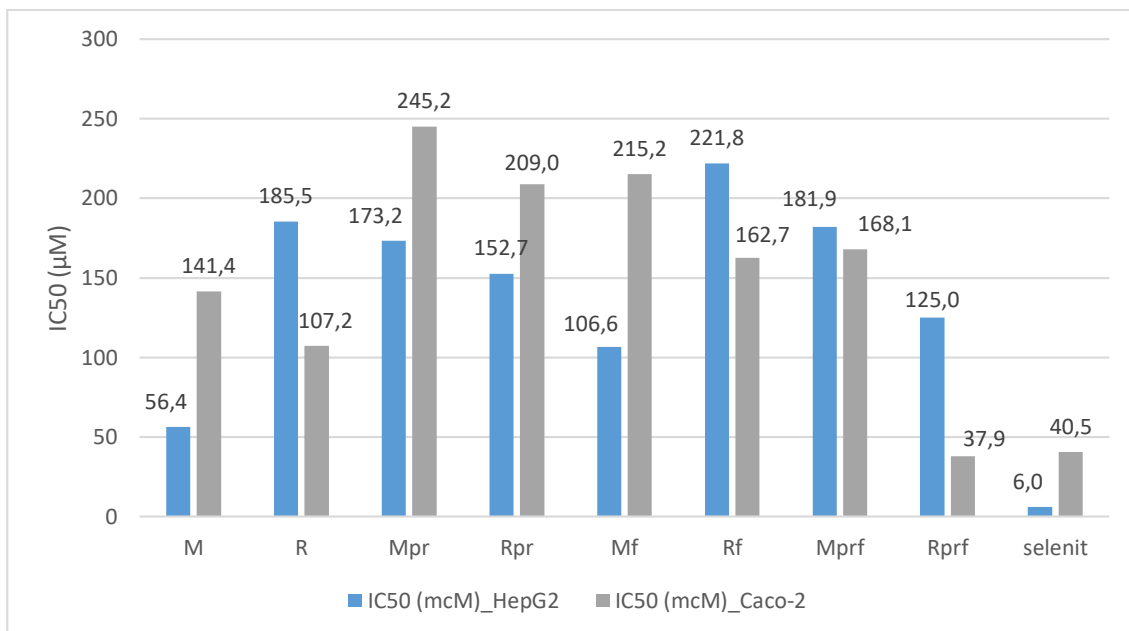
Ovisnosti postotka inhibicije apsorpcije o logaritmu koncentracije ispitivanih nanočestica selena odnosno selenita na Caco2 i HepG2 staničnim linijama prikazane su na Slikama 10 i 11. Iz funkcija prikazanih ovisnosti izračunate su IC50 vrijednosti za analizirane uzorke koje su prikazane na Slici 12.

Iz dobivenih vrijednosti IC50 za staničnu liniju HepG2 slijedi da najveću toksičnost pokazuje anorganski oblik selena, selenit. Bez obzira na korištene ekscipijense prilikom biosinteze, svi uzorci nanoselena pokazali su manju toksičnost od selenita.

IC50 vrijednosti istraživanih nanočestica kretale su se od 56.4-245.2  $\mu\text{g/mL}$ , ovisno o primijenjenoj kombinaciji stabilizatora (vrsta pektina i prisutnost EKM) i vrsti stanica. Navedeni rezultati u skladu su sa sličnim istraživanjem gdje je IC50 vrijednost fito-funkcionaliziranih nanočestica selena određena MTT testom na staničnim kulturama N2a bila oko 100  $\mu\text{g/mL}$  (Gunti i sur., 2019). Najveću toksičnost pokazale su čestice stabilizirane pektinima mandarine, koje su ujedno i čestice najmanjeg promjera što je u skladu s istraživanjima koja pokazuju da čestice manjeg promjera obično pokazuju i veću toksičnost (Kapur i sur., 2017).

Iz rezultata dobivenih na staničnoj liniji HepG2 je vidljivo da su nanočestice selena stabilizirane pektinom mandarine toksičnije od onih stabiliziranih pektinom rajčice. Dodatkom ekstrakta komine masline u reakcijsku smjesu toksičnost dobivenih nanosustava se smanjuje, neovisno o vrsti pektina korištenog u sintezi. (pektin komine rajčice ili pektin kore mandarine). Opaženi učinci mogu se objasniti činjenicom da polifenoli EKM pokazuju značajan antioksidativni i antikancerogeni učinak što je potvrđeno brojnim znanstvenim studijama (Radić i sur., 2020; Boss i sur., 2016). Također, funkcionalizirane nanočestice imale su veći srednji promjer što je možda doprinijelo njihovoj manjoj toksičnosti. Slični učinci funkcionalizacije se primjećuju i u slučaju korištenja pročišćenih frakcija pektina kore mandarine, ali ne primjećuju se u uzorcima stabiliziranim pročišćenim frakcijama pektina rajčice.

Rezultati dobiveni na staničnim linijama Caco-2 stanica nešto su drugačiji. Naime, iz dobivenih IC50 vrijednosti vidi se veća toksičnost nanoselena stabiliziranog pektinom rajčice. Također iz rezultata slijedi da je dodatak ekstrakta komine masline u uzorke stabilizirane nativnim pektinom smanjio toksičnost. Međutim, taj se učinak ne vidi kod uzoraka stabiliziranih pročišćenim pektinima. Navedeno je sukladno rezultatima dobivenim na staničnim kulturama HepG2.



**Slika 12:** IC50 vrijednosti analiziranih uzoraka za stanične linije HepG2 i Caco-2.

M – uzorak sintetiziranog nanoselena uz sirovi pektin mandarine kao sredstvo za oblaganje; R – uzorak sintetiziranog nanoselena uz sirovi pektin rajčice kao sredstvo za oblaganje; Mpr – uzorak sintetiziranog nanoselena uz pročišćeni pektin mandarine kao sredstvo za oblaganje; Rpr – uzorak sintetiziranog nanoselena uz pročišćeni pektin rajčice kao sredstvo za oblaganje; Mf – uzorak sintetiziranog nanoselena uz sirovi pektin mandarine kao sredstvo za oblaganje te uz dodatak ekstrakta komine masline; Rf - uzorak sintetiziranog nanoselena uz sirovi pektin rajčice kao sredstvo za oblaganje te uz dodatak ekstrakta komine masline; Mprf – uzorak sintetiziranog nanoselena uz pročišćeni pektin mandarine kao sredstvo za oblaganje te uz dodatak ekstrakta komine masline; Rprf – uzorak sintetiziranog nanoselena uz pročišćeni pektin rajčice kao sredstvo za oblaganje te uz dodatak ekstrakta komine masline

## 5 ZAKLJUČCI

- 1 Sintezom nanočestica seleno uz stabilizaciju sirovim ili pročišćenim pektinima komine rajčice i mandarine kao sredstava za oblaganje te dodatnu funkcionalizaciju ekstraktom komine masline moguće je dobiti nanosustave zadovoljavajućih fizikalno-kemijskih svojstava.
- 2 Dodatak ekstrakta komine masline u reakcijsku smjesu povećava prinos procesa biosinteze.
- 3 Dobivene nanosustave karakterizira unimodalna raspodjela veličine čestica s prosječnom veličinom raspona od 110,4 nm do 235,4 nm što ukazuje na njihov povoljan sigurnosni profil. Čestice stabilizirane pektinima kore mandarine bile su veće od onih stabiliziranih pektinom rajčice. Funkcionalizacija ekstraktom komine masline rezultirala je nastankom većih nanočestica.
- 4 Mjerenjem zeta potencijala, utvrđeno je da se svi dobiveni sustavi mogu smatrati stabilnima s obzirom na vrijednosti zeta potencijala te da je biosinteza u tom kontekstu bila uspješna. Zeta potencijali čestica novosintetiziranog nanoselena kretali su se od -25,9 mV do -21,1 mV. Uzorci kojima je prilikom sinteze dodan ekstrakt komine masline pokazali su negativniji zeta potencijal.
- 5 Određivanjem citotoksičnosti nanoselena pomoću MTT testa i računanjem IC<sub>50</sub> za staničnu liniju HepG2 utvrđeno je da svi uzorci nanoselena imaju puno manju toksičnost za HepG2 stanice od anorganskog oblika seleno, selenita. Vrijednosti IC<sub>50</sub> za nanoselen kretale su se u rasponu od 56,41 μM do 221,8 μM. Nanoselen stabiliziran pektinom mandarine ima manju vrijednost IC<sub>50</sub> te je kao takav toksičniji od onog stabiliziranog pektinom rajčice. Dodatkom ekstrakta komine masline prilikom postupka sinteze IC<sub>50</sub> vrijednosti rastu odnosno toksičnost se smanjuje. Navedeno je vjerojatno posljedica antikancerogenih učinaka polifenola prisutnih u ekstraktu komine masline te činjenice da su funkcionalizirane nanočestice imale veći srednji promjer.
- 6 Određivanjem citotoksičnosti nanoselena pomoću MTT testa i računanjem IC<sub>50</sub> za staničnu liniju Caco-2 utvrđeno je da uzorci nanoselena sintetiziranog metodom biosinteze uglavnom imaju veće vrijednosti IC<sub>50</sub> odnosno manju toksičnost za stanice od anorganskog oblika seleno, selenita. Nanoselen stabiliziran pektinom rajčice toksičniji je od onog stabiliziranog pektinom mandarine. Dodatkom ekstrakta komine masline u uzorke stabilizirane nativnim pektinom toksičnost se smanjuje što je sukladno rezultatima dobivenima na staničnoj liniji HepG.

## 6 LITERATURA

Arzumanian VA, Kiseleva OI, Poverennaya, EV. The Curious Case of the HepG2 Cell Line: 40 Years of Expertise. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, 22(23), 13135. Bhattacharjee S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *J Control Release*, 2016, 235, 337–351.

Boss A, Bishop K, Marlow G, Barnett M, Ferguson L. Evidence to Support the Anti-Cancer Effect of Olive Leaf Extract and Future Directions. *Nutrients*, 2016, 8(8), 513.

Bryant G, Thomas JC. Improved Particle Size Distribution Measurements Using Multiangle Dynamic Light Scattering. *Langmuir*, 1995, 11(7), 2480–2485.

Chan SY, Choo WS, Young DJ, Loh XJ. Pectin as a rheology modifier: Origin, structure, commercial production and rheology. *Carbohydr. Polym.*, 2017, 161, 118–139.

Cui D, Liang T, Sun L, Meng L, Yang C, Wang L, Liang T, Li Q. Green synthesis of selenium nanoparticles with extract of hawthorn fruit induced HepG2 cells apoptosis. *Pharm. Biol.* 2018, 56(1), 528–534.

Čepo DV, Radić K, Jurmanović S, Jug M, Rajković MG, Pedisić S, Moslovac T, Albahari P. Valorization of olive pomace-based nutraceuticals as antioxidants in chemical, food and biological models. *Molecules*, 2018, 23(8), 2070.

Ćetković G, Savatović S, Čanadanović-Brunet J, Djilas S, Vulić J, Mandić A, Četojević-Simin D. Valorisation of phenolic composition, antioxidant and cell growth activities of tomato waste. *Food Chem.*, 2012, 133(3), 938–945.

Del Valle M, Cámara M, Torija ME. Chemical characterization of tomato pomace. *J. Sci. Food Agric.*, 2006, 86(8), 1232–1236.

Difonzo G, Troilo M, Squeo G, Pasqualone A, Caponio F. Functional compounds from olive pomace to obtain high-added value foods – a review. *J. Sci. Food Agric.*, 2020, 101(1), 15–26.

Donato MT, Tolosa L, Gómez-Lechón MJ. Culture and Functional Characterization of Human Hepatoma HepG2 Cells. U: *Protocols in In Vitro Hepatocyte Research, Methods in Molecular Biology*, Vinken M, Rogiers V, urednici, New York, Springer New York, 2016, str. 77–93.

El-Ramady HR, Domokos-Szabolcsy E, Abdalla NA, Alshaal TA, Shalaby TA, Sztrik A, Prokisch J, Fari M. Selenium and nano-selenium in agroecosystems. *Environ Chem Lett*, 2014, 12, 495–510.

Endress HU, Mattes F. Pectin. U: *Fiber Ingredients Food Applications and Health Benefits*. Cho S, Samuel P, urednici, Boca Raton, CRC Press, 2009, str. 135-160.

Fardsadegh B, Jafarizadeh-Malmiri H. Aloe vera leaf extract mediated green synthesis of selenium nanoparticles and assessment of their in vitro antimicrobial activity against spoilage fungi and pathogenic bacteria strains. *Green Process. Synth*, 2019, 8, 399–407.

Globalna proizvodnja mandarina, 2021., <https://citrusindustry.net/2021/02/24/tangerine-and-mandarin-global-production-to-increase/>, pristupljeno 2.5.2022.

González-Larrazza PG, López-Goerne TM, Padilla-Godínez FJ, González-López MA, Hamdan-Partida A, Gómez E. IC50 Evaluation of Platinum Nanocatalysts for Cancer Treatment in Fibroblast, HeLa, and DU-145 Cell Lines. *ACS Omega*, 2020, 5(39), 25381–25389.

Gunti L, Dass RS, Kalagatur NK. Phytofabrication of Selenium Nanoparticles From *Emblica officinalis* Fruit Extract and Exploring Its Biopotential Applications: Antioxidant, Antimicrobial, and Biocompatibility. *Front. Microbiol.*, 2019, 10.

Hayat K, Zhang X, Farooq U, Abbas S, Xia S, Jia C, Zhong F, Zhang J. Effect of microwave treatment on phenolic content and antioxidant activity of citrus mandarin pomace. *Food Chem*, 2010, 123(2), 423-429.

Hosnedlova B, Kepinska M, Skalickova S, Fernandez C, Ruttkay-Nedecky B, Peng Q, Baron M, Melcova M, Opatrilova R, Zidkova J, Bjørklund G, Sochor J, Kizek R. Nano-selenium and its nanomedicine applications. *Int J Nanomedicine*, 2018, 13, 2107–2128.



Ingale A, Chaudhari AN. Biogenic Synthesis of Nanoparticles and Potential Applications: An Eco-Friendly Approach. *J Nanomed Nanotech*, 2013, 4, 3-6.

J.Ngenefeme FT, J. Eko N, D. Mbom, Y, D. Tantoh N, M. Rui, KW. A One Pot Green Synthesis and Characterisation of Iron Oxide-Pectin Hybrid Nanocomposite. *Open J. Compos. Mater.*, 2013, 03(02), 30–37.

Kim HA, Seo JK, Kim T, Lee BT. Nanometrology and its perspectives in environmental research. *Environ Health Toxicol*, 2014, 29, 2014016.

Kirupagaran R, Saritha A, Bhuvanewari S. Green Synthesis of Selenium Nanoparticles from Leaf and Stem Extract of *Leucas lavandulifolia* Sm., and Their Application. *J Nanosci NanoTechnol*, 2016, 2(5), 224-226.

Korde P, Ghotekar S, Pagar T, Pansambal S, Oza R, Mane D. Plant extract assisted eco benevolent synthesis of selenium nanoparticles-a review on plant parts involved, characterization and their recent applications. *J Chem Rev*, 2020, 157-168.

Kuchur OA, Tsymbal SA, Shestovskaya MV, Serov NS, Dukhinova MS, Shtil AA. Metal-derived nanoparticles in tumor theranostics: Potential and limitations, *J. Inorg. Biochem.*, 2020, 209, 111117.

Lea T. Caco-2 Cell Line. U: The Impact of Food Bio-Actives on Gut Health. Verhoeckx K, Cotter P, López-Expósito I, Kleiveland C, Lea T, Mackie A, Requena T, Swiatecka D, Wichers H, urednici, Cham, Springer International Publishing, 2015, str. 103-111.

Mellinas C, Jiménez A, Garrigós C. Microwave-Assisted Green Synthesis and Antioxidant Activity of Selenium Nanoparticles Using *Theobroma cacao* L. Bean Shell Extract, *Molecules*, 2019, 24, 40-48.

Murugesan G, Nagaraj K, Sunmathi D, Subramani K. Methods involved in the synthesis of selenium nanoparticles and their different applications. *European j. biomed. pharm.*, 2019, 6, 189–194.

Nair AB, Morsy MA, Shinu P, Kotta S, Chandrasekaran M, Tahir A. Advances of non-iron metal nanoparticles in biomedicine. *J. Pharm. Pharm. Sci.*, 2021, 24, 41–61.

Pektin značenje i definicija, [www.jezikoslovac.com](http://www.jezikoslovac.com), pristupljeno 15. 4. 2022.

Präbst K, Engelhardt H, Ringgeler S, Hübner H. (2017). Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin. U: *Cell Viability Assays: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. Gilbert DF, Friedrich O, urednici, New York, Springer Science+Business Media LLC, 2017, str. 1-17.

Radić K, Vinković Vrček I, Pavičić I, Čepo DV. Cellular Antioxidant Activity of Olive Pomace Extracts: Impact of Gastrointestinal Digestion and Cyclodextrin Encapsulation. *Molecules*, 2020, 25(21), 5027.

Ribeiro TB, Oliveira A, Coelho M, Veiga M, Costa EM, Silva, S, Nunes J, Vicente AA, Pintado M. Are olive pomace powders a safe source of bioactives and nutrients? *J. Sci. Food Agric.*, 2020, 101(5), 1963–1978.

Skalickova S, Milosavljevic M, Cihalova K, Horky P, Richtera L, Adam V. Selenium nanoparticles as a nutritional supplement. *Nutrition*, 2017, 33, 83–90.

UV/ VIS spektroskopija, <https://chem.libretexts.org/>, pristupljeno 1.5.2022.

Zahran MK, Ahmed HB, El-Rafie MH, ‘Facile size-regulated synthesis of silver nanoparticles using pectin’, *Carbohydr. Polym.*, 2014, 111, 971–978.

## SAŽETAK

U ovom istraživanju razvijeni su postupci biosinteze nanoselena uz stabilizaciju pektinima rajčice i mandarine kao sredstava za oblaganje te uz dodatnu funkcionalizaciju ekstraktom komine masline (EKM) bogatim polifenolima. Nakon provedene sinteze, provedena je fizikalno-kemijska karakterizacija dobivenih nanosustava te je ispitan njihov učinak na stanične linije HepG2 i Caco-2. Dodatkom EKM povećan je prinos sinteze, a nanočestice su pokazale unimodalni tip raspodjele s rasponom veličine srednjeg promjera 110,4 do 235,4 nm. Zeta potencijal novosintetiziranih sustava kretao se u rasponu od -25,9 mV do -21,1 mV, gdje su negativnije vrijednosti dobivene u funkcionaliziranim nanočesticama.  $IC_{50}$  vrijednosti sintetiziranih nanosustava kretale su se 56,4-245,2  $\mu\text{g/mL}$ . Selen u nanoobliku pokazao je manju toksičnost od selenita, a uzorci funkcionalizirani EKM uglavnom su pokazali manju toksičnost u odnosu na nefunkcionalizirane uzorke. Primjenom pektina komine mandarine i rajčice moguće je dobiti nanočestice selena, smanjene toksičnosti (u odnosu na selenit) i odgovarajućih fizikalno-kemijskih i funkcionalnih svojstava, uključujući i antikancerogeno djelovanje, koja se dodatno poboljšavaju funkcionalizacijom ekstrakta komine masline.

## SUMMARY

In this paper, we investigated the possibility of nanoselenium biosynthesis using tomato- and mandarin pomace derived pectins as coating agents and olive pomace extract (OPE) as the functionalization agent. The relative yields of the newly proposed synthesis processes were examined by UV / VIS spectroscopy; the size and stability of the nanoparticles were determined by using the dynamic light scattering technique and by measuring zeta potential. The anticancer effects of obtained nanoparticles were investigated in HepG2 and Caco-2 cell lines. using the colorimetric MTT method, and the IC<sub>50</sub> value was calculated for each sample. Using these methods, it was determined that unimodal particle size distribution was obtained by proposed biosynthesis processes with average diameters ranging from 110.4 to 235.4 nm. Zeta potential of investigated nanosystems ranged from -25.9 mV to -21.1 mV and therefore all obtained samples can be considered stable. Samples functionalized with OPE showed lower negative values of zeta potential indicating improved stability. IC<sub>50</sub> values for the HepG2 cell line showed that all nanoselenium samples had significantly lower toxicity in comparison to the inorganic form of selenium, selenite. Similar was shown on Caco-2 cell culture with the exception of a sample synthesized with purified tomato pectin and with the addition of OPE that showed higher toxicity than selenite. In conclusion, with this type of biosynthesis, it is possible to synthesize stable selenium nanoparticles that show less toxicity in comparison to selenite and possess anticancer effects that are additionally improved by functionalization by OPE.

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za kemiju prehrane  
Domagojeva 2, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### Antikancerogena aktivnost nanočestica seleno stabiliziranih pektinima rajčice i mandarine

Lucija Tesla

#### SAŽETAK

U ovom istraživanju razvijeni su postupci biosinteze nanoselena uz stabilizaciju pektinima rajčice i mandarine kao sredstava za oblaganje te uz dodatnu funkcionalizaciju ekstraktom komine masline (EKM) bogatim polifenolima. Nakon provedene sinteze, provedena je fizikalno-kemijska karakterizacija dobivenih nanosustava te je ispitan njihov učinak na stanične linije HepG2 i Caco-2. Dodatkom EKM povećan je prinos sinteze, a nanočestice su pokazale unimodalni tip raspodjele s rasponom veličine srednjeg promjera 110,4 do 235,4 nm. Zeta potencijal novosintetiziranih sustava kretao se u rasponu od -25,9 mV do -21,1 mV, gdje su negativnije vrijednosti dobivene u funkcionaliziranim nanočesticama. IC<sub>50</sub> vrijednosti sintetiziranih nanosustava kretale su se 56.4-245.2 µg/mL. Selen u nanoobliku pokazao je manju toksičnost od selenita, a uzorci funkcionalizirani EKM uglavnom su pokazali manju toksičnost u odnosu na nefunkcionalizirane uzorke. Primjenom pektina komine mandarine i rajčice moguće je dobiti nanočestice seleno, smanjene toksičnosti (u odnosu na selenit) i odgovarajućih fizikalno-kemijskih i funkcionalnih svojstava, uključujući i antikancerogeno djelovanje, koja se dodatno poboljšavaju funkcionalizacijom ekstrakta komine masline.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 54 stranice, 12 grafičkih prikaza, 6 tablica i 35 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Nanoselen, pektin, komina mandarine, komina rajčice, antikancerogeno djelovanje, stanična linija HepG2, stanična linija Caco-2.

Mentor: **Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.  
**Dr. sc. Petra Turčić**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.  
**Dr. sc. Kristina Radić**, viša asistentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: srpanj 2022.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of food chemistry  
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### **Anticancer activity of selenium nanoparticles synthesized with tomato and tangerine pectins as a coating agent**

**Lucija Tesla**

#### **SUMMARY**

In this paper, we investigated the possibility of nanoselenium biosynthesis using tomato- and mandarin pomace derived pectins as coating agents and olive pomace extract (OPE) as the functionalization agent. The relative yields of the newly proposed synthesis processes were examined by UV / VIS spectroscopy; the size and stability of the nanoparticles were determined by using the dynamic light scattering technique and by measuring zeta potential. The anticancer effects of obtained nanoparticles were investigated in HepG2 and Caco-2 cell lines. using the colorimetric MTT method, and the IC50 value was calculated for each sample. Using these methods, it was determined that unimodal particle size distribution was obtained by proposed biosynthesis processes with average diameters ranging from 110.4 to 235.4 nm. Zeta potential of investigated nanosystems ranged from -25.9 mV to -21.1 mV and therefore all obtained samples can be considered stable. Samples functionalized with OPE showed lower negative values of zeta potential indicating improved stability. IC50 values for the HepG2 cell line showed that all nanoselenium samples had significantly lower toxicity in comparison to the inorganic form of selenium, selenite. Similar was shown on Caco-2 cell culture with the exception of a sample synthesized with purified tomato pectin and with the addition of OPE that showed higher toxicity than selenite. In conclusion, with this type of biosynthesis, it is possible to synthesize stable selenium nanoparticles that show less toxicity in comparison to selenite and possess anticancer effects that are additionally improved by functionalization by OPE.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 54 pages, 12 figures, 6 tables and 35 references. Original is in Croatian language.

**Keywords:** Nanoselenium, tangerine pomace, tomato pomace, anticancer properties, HepG2 cell line, Caco-2 cell line.

**Mentor:** **Dubravka Vitali Čepo, Ph.D.**, *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

**Reviewers:** **Dubravka Vitali Čepo, Ph.D.**, *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.  
**Petra Turčić, Ph.D.**, *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.  
**Kristina Radić, Ph.D.**, *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

The thesis was accepted: July 2022.